

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

CARRERA DE INGENIERÍA QUÍMICA

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INULINA A PARTIR DEL AJO

TESIS DE GRADO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA QUÍMICA

AUTOR: MARITZA ELIZABETH FUERTES MANTILLA

TUTOR: ING. MARIO ROMEO CALLE MIÑACA

QUITO

2014

APROBACIÓN DEL TUTOR

En calidad de Tutor de la tesis titulada: “EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INULINA A PARTIR DEL AJO”, me permito certificar que el mismo es original y ha sido desarrollado por la Señorita MARITZA ELIZABETH FUERTES MANTILLA bajo mi dirección y conforme a todas las observaciones realizadas, considero que la tesis reúne los requisitos necesarios.

En la ciudad de Quito, a los días 20 del mes de marzo del 2014

A handwritten signature in blue ink, consisting of a large 'M' and a stylized 'C', is positioned above a horizontal line.

Ing. Mario Calle M.
PROFESOR TUTOR

APROBACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL

Yo, MARITZA ELIZABETH FUERTES MANTILLA en calidad de autor de la tesis de grado realizada sobre EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INULINA A PARTIR DEL AJO, por la presente autorizo a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o de parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autora me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8, 19 y demás pertinentes de la Ley de la Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, 20 de Marzo de 2014



Maritza Fuertes M.

C.C. 1003074422

maritza_fuertes@hotmail.com

*A Dios, mis padres, mi abuelita,
mis hermanos y sobrinos
con todo mi amor*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por siempre guiarme y bendecir mi camino.

A mis padres Gabriel y Priscila, porque siempre han estado a mi lado en todo momento, han formado parte de esta etapa de mi vida en todo aspecto, siendo mis principales guías de formación personal.

A mi abuelita Emma y mis hermanos Andrea, Gabriela, Cristina y Diego mis mejores amigos, por compartir cada momento en esta etapa importante de mi vida.

A mi novio Pablo Calle por su apoyo y por compartir conmigo este momento importante para mí.

A la Universidad Central del Ecuador y principalmente a mi querida Facultad de Ingeniería Química por permitirme estudiar en sus aulas y cumplir una meta más, con una formación integra ética, moral y profesional.

A los Ingenieros: Luis Calle, César Alvarado y Carlos Guepud por su colaboración para desarrollar la parte experimental del trabajo.

Al Ingeniero Mario Calle Tutor y excelente profesor, por su valiosa orientación brindada para desarrollar y culminar mi trabajo.

A Yadira Mora por incondicionalmente ayudarme en una parte fundamental para el desarrollo del trabajo.

A mis profesores que han compartido sus conocimientos y experiencias, brindándonos una excelente formación profesional, y que sin duda son partícipes de este logro.

CONTENIDO

	pág.
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABLAS.....	xii
LISTA DE GRÁFICOS	xiv
LISTA DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN	1
1. AJO	3
1.1. Clasificación, origen y descripción de la especie.....	3
1.1.1. <i>Hábitat</i>	3
1.2. Química del ajo	4
1.3. Propiedades del ajo.....	6
2. INULINA.....	7
2.1. Fuentes de inulina: microorganismos y plantas	7
2.2. Estructura química.....	9
2.3. Propiedades	10
2.3.1. <i>Propiedades físicas y químicas</i>	10
2.3.2. <i>Propiedades biológicas</i>	11
2.4. Aceptabilidad intestinal y factores negativos	14
2.5. Aplicaciones	15
2.6. Métodos de análisis y cuantificación	17

3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO	19
3.1. Fundamentos	19
3.2. Factores que afectan la velocidad de extracción	19
3.3. Curvas de equilibrio	20
3.3.1. <i>Triángulo rectángulo</i>	20
3.3.1.1. <i>Efecto de la saturación</i>	20
3.3.1.2. <i>Flujo inferior o refinado</i>	22
3.3.2. <i>Diagrama rectangular</i>	23
3.4. Métodos de cálculo.....	24
3.5. Transferencia de masa	25
4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	28
4.1. Componentes del HPLC.....	28
4.1.1. <i>Reservorios de la fase móvil</i>	29
4.1.2. <i>Sistema de bombeo</i>	29
4.1.3. <i>Sistema de inyección</i>	30
4.1.4. <i>Columna</i>	31
4.1.5. <i>Detector</i>	32
4.1.6. <i>Registrador de datos</i>	32
4.2. Calibración del cromatógrafo	33
4.2.1. <i>Método de la recta de calibrado</i>	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1. Metodología	34
5.1.1. <i>Diseño experimental</i>	34
5.1.2. <i>Preparación del cromatógrafo</i>	35
5.2. Sustancias y reactivos.....	36
5.3. Materiales y equipos.....	36
5.4. Procedimiento	37

5.4.1. Procedimiento para determinar la humedad del ajo	37
5.4.2. Procedimiento de la extracción de inulina del ajo	37
5.4.3. Procedimiento de la purificación del extracto	38
5.4.4. Procedimiento de la cuantificación de inulina en el HPLC	38
5.5. Diagrama de flujo del procedimiento de extracción y cuantificación de inulina del ajo	40
5.6. Datos experimentales	41
5.6.1. Datos de masa húmeda y seca de ajo para cuantificar humedad	41
5.6.2. Datos de la extracción de inulina del ajo	41
5.6.4. Datos de la cuantificación de inulina en el extracto purificado.	43
5.6.5. Datos adicionales	44
 6. CÁLCULOS Y RESULTADOS	 45
6.1. Cálculo del promedio de humedad del ajo.....	45
6.2. Cálculo de la variable relación agua/ajo.	45
6.3. Cálculo de la cantidad de agua retenida en el refinado	46
6.4. Cálculo del volumen de agua retenido en el refinado.	47
6.5. Cálculo de la cantidad de agua retenida en la purificación primaria	49
6.6. Cálculo del volumen de agua retenido en la purificación primaria.	50
6.7. Cálculo de la concentración promedio de inulina medida en el HPLC	51
6.8. Cálculo de la cantidad de inulina en el extracto purificado.....	52
6.9. Cálculo de la concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua.....	53
6.10. Cálculo de la cantidad de inulina en el refinado	55
6.11. Cálculo de la cantidad de inulina retenida en la purificación primaria	56
6.12. Cálculo de la cantidad y porcentaje de inulina en el ajo	57
6.13. Cálculo de las coordenadas para el trazado de la curva de refinado en el diagrama triangular de extracción sólido-líquido.....	59
 7. DISCUSIÓN	 65

8. CONCLUSIONES	67
9. RECOMENDACIONES	68
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	69
BIBLIOGRAFÍA	71
ANEXOS	74

LISTA DE CUADROS

pág.

Cuadro 1. Composición nutritiva del ajo (Por 100 g de producto comestible)	5
Cuadro 2. Porcentaje de inulina en peso fresco desde algunas fuentes importantes	8
Cuadro 3. Contenido de Inulina (% en peso fresco) de plantas que son comúnmente usadas en la nutrición humana.....	8

LISTA DE FIGURAS

pág.

Figura 1. Estructura básica de la inulina: Izquierda, con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) GFn. Derecha, con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) Fm.....	9
Figura 2. Representación de los componentes en el triángulo rectángulo.....	20
Figura 3. Efecto de la saturación: soluto inicialmente como un sólido	21
Figura 4. Efecto de la saturación: soluto inicialmente en forma líquida.	22
Figura 5. Representación en el diagrama triangular del flujo inferior o refinado.....	22
Figura 6. Representación de los componentes en el diagrama rectangular.	23
Figura 7. Esquema de flujo para extracción sólido-líquido en contacto sencillo	24
Figura 8. Representación de las concentraciones de las corrientes de la extracción sólido-líquido en contacto sencillo.....	25
Figura 9. Componentes principales del HPLC	28
Figura 10. Sistema de inyección basado en lazos de muestreo.	31
Figura 11. Recta de calibración directa	33
Figura 12. Esquema de las experimentaciones obtenidas con la combinación de las variables de proceso.	35
Figura 13. Diagrama de flujo de la extracción y cuantificación de inulina del ajo	40
Figura 14. Representación en el diagrama triangular de las curvas de refinado de las experimentaciones básicas.	63
Figura 15. Representación en el diagrama triangular de las curvas de refinado de las réplicas	64

LISTA DE TABLAS

pág.

Tabla 1. Masas de ajo para cuantificar humedad	41
Tabla 2. Extracción de inulina a T = 30°C	41
Tabla 3. Extracción de inulina a T = 55°C	41
Tabla 4. Extracción de inulina a T = 80°C	42
Tabla 5. Purificación del extracto a T = 30 °C	42
Tabla 6. Purificación del extracto a T = 55 °C	42
Tabla 7. Purificación del extracto a T = 80 °C	43
Tabla 8. Cuantificación de inulina a T=30 °C	43
Tabla 9. Cuantificación de inulina a T=55 °C	43
Tabla 10. Cuantificación de inulina a T=80 °C	43
Tabla 11. Densidad del agua	44
Tabla 12. Densidad de la inulina	44
Tabla 13. Resultados de la variable relación agua/ajo	46
Tabla 14. Cantidad de agua retenida en el refinado a T = 30°C.....	46
Tabla 15. Cantidad de agua retenida en el refinado a T=55 °C.....	47
Tabla 16. Cantidad de agua retenida en el refinado a T=80 °C.....	47
Tabla 17. Cantidad de agua retenida en el refinado a T=80 °C.....	48
Tabla 18. Volumen de agua retenido en el refinado a T = 55 °C.....	48
Tabla 19. Volumen de agua retenido en el refinado a T = 80 °C.....	48
Tabla 20. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T = 30 °C	49
Tabla 21. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T = 55 °C	49
Tabla 22. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T = 80 °C	49
Tabla 23. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T = 30 °C.....	50
Tabla 24. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T = 55 °C.....	50
Tabla 25. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T = 80 °C.....	50
Tabla 26. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T = 30°C.....	51
Tabla 27. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T = 55°C.....	51
Tabla 28. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T = 80°C.....	52

Tabla 29. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T = 30°C	52
Tabla 30. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T = 55°C	52
Tabla 31. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T = 80°C	53
Tabla 32. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T=30°C.....	54
Tabla 33. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T=55°C.....	54
Tabla 34. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T=80°C.....	54
Tabla 35. Cantidad de inulina en el refinado a T = 30°C.....	55
Tabla 36. Cantidad de inulina en el refinado a T = 55°C.....	55
Tabla 37. Cantidad de inulina en el refinado a T = 80°C.....	56
Tabla 38. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T =30°C.....	56
Tabla 39. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T = 55°C	56
Tabla 40. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T = 80°C	57
Tabla 41. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 30°C.....	58
Tabla 42. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 55°C.....	58
Tabla 43. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 80°C.....	58
Tabla 44. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T = 30°C	60
Tabla 45. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T = 55°C	61
Tabla 46. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T = 80°C	62

LISTA DE GRÁFICOS

pág.

Gráfico 1. Curva de refinado a $T=30^{\circ}\text{C}$	60
Gráfico 2. Curva del refinado a $T=55^{\circ}\text{C}$	61
Gráfico 3. Curva del refinado a $T=80^{\circ}\text{C}$	62
Gráfico 4. Curvas del refinado de los experimentos básicos	63
Gráfico 5. Curvas del refinado de las réplicas.	64

LISTA DE ANEXOS

pág.

ANEXO A. Hoja de especificaciones de la inulina BERNEO HP.....	75
ANEXO B. Reporte fotográfico de la extracción inulina y purificación de la solución de inulina	77
ANEXO C. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución para cuantificar inulina	79
ANEXO D. Recta de calibración del HPLC y reporte de inulina para las condiciones recomendadas de cuantificación	80
ANEXO E. Recta de calibración del HPLC y reporte de inulina para las mejores condiciones de extracción	82

EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE INULINA A PARTIR AJO

RESUMEN

Obtención de inulina a partir del ajo mediante extracción sólido-líquido, utilizando agua como solvente. En el proceso de extracción que se lleva a cabo durante 45 minutos y con agitación constante, se varía la relación agua/ajo: 2, 3 y 4 [ml agua/ g ajo] y la temperatura: 30, 55 y 80 [°C]. El refinado obtenido de la filtración del extracto se secó y se pesó; cada extracto se purifica mediante carbonatación e intercambio de iones y se cuantifica la inulina en la solución con el método de cromatografía líquida de alta resolución.

Los resultados indican que el ajo contiene aproximadamente un 18 % de inulina y las mejores condiciones de extracción son: temperatura de 80°C y relación agua/ajo de 4, para obtener alrededor de 30,7 g de inulina en el extracto purificado a partir de 200 g de materia prima. Además se observa que es posible cuantificar inulina del ajo blanco común, trabajando a una temperatura de 80°C y relación agua/ajo de 3. La curva de refinado indica que la capacidad de retención de la solución de inulina en el refinado a las condiciones de trabajo es ligeramente mayor a 80 que a 55 °C.

PALABRAS CLAVES: / AJO/ ALLIUM SATIVUM/ EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO/ FRUCTANOS/ POLISACÁRIDOS/ INULINA/ ANÁLISIS CUANTITATIVO/ HPLC/

EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF INULIN FROM GARLIC

ABSTRACT

Getting inulin from garlic by leaching, using water as solvent. In the extraction process which is carried out during 45 minutes with constant stirring, relation water/garlic: 2, 3 y 4 [ml water/ g garlic] and temperature: 30, 55 y 80 [°C] are varied. The refined obtained from the filtration of the extract is dried and weighed; each extract was purified by carbonation and ion exchange and inulin in the solution it quantifies by the method high performance liquid chromatography.

The results indicate garlic contains approximately 18% inulin and the best extraction condition are: temperature 80°C and relation water/garlic of 4, to obtain around 30,7 g of inulin the purified extract from 200 g of raw material. It is also observed that is possible to quantify inulin of porcelain garlic, operating at temperature of 80°C and a relation water/garlic 3. Refined curve indicates that the retention capacity of the inulin solution in the refined in working conditions is slightly greater than 80 compared to 55 °C.

KEYWORDS: / GARLIC/ ALLIUM SATIVUM/ LEACHING/ FRUCTANS/ POLI_ SACCHARIDES/ INULIN/ QUANTITATIVE ANALYSIS/ HPLC/

INTRODUCCIÓN

Allium sativum, el ajo, es una especie originaria de Asia, clasificada dentro de la familia de las Liliáceas. Es ampliamente cultivada y desde siglos atrás se la ha utilizado como alimento y planta medicinal. En su composición química se encuentran una gran cantidad de componentes que le atribuyen sus beneficios, entre estos, la inulina.

La inulina es un polímero natural que está siendo utilizado en importantes industrias mejorando las características de diversos productos y permitiendo obtener nuevos con aplicaciones importantes. Es un polisacárido tipo fructanos que se encuentra en alrededor de 30000 plantas, como reserva energética. Es clasificada como fibra dietética soluble que resiste a la hidrólisis enzimática digestiva, denominándola como alimento prebiótico, brindando múltiples efectos benéficos en las funciones específicas del organismo, en especial las del sistema digestivo, disminuye el riesgo de padecer cáncer de colon, favorece la salud de los huesos ya que aumenta la absorción de calcio y minerales, disminuye el nivel de lípidos y glucosa en la sangre, fortalece el sistema inmune entre otros.

La aplicación de inulina tiene importantes beneficios tecnológicos, principalmente en las industrias de alimentos y farmacéutica. En formulaciones de alimentos mejora las propiedades organolépticas, además de ser un buen sustituto de grasas sin modificar las texturas, lo que permite un mejor sabor y sensación en la boca de una variedad de productos, mencionando algunos como lácteos fermentados, confites, chocolates, bebidas, postres congelados, cereales para el desayuno, barras energéticas, cárnicos, productos de baja cantidad en grasas o azúcares debido a la baja cantidad de calorías que proporciona, preparaciones de frutas y jarabe de fructosa. Es utilizado como estabilizador y excipiente en formulaciones de medicamentos debido a su alta afinidad con múltiples componentes, es fórmula de varios productos nutricionales. Además en la industria cosmetológica y química, se han realizado estudios como aditivo de tensoactivos, como coagulante en el tratamiento de agua, producción de alcohol, base para elaborar carboxi-inulina como anticorrosivo, de las que se pueden destacar.

El objetivo de la tesis es extraer y cuantificar la cantidad de inulina presente en el ajo, dándole a este alimento de consumo habitual un beneficio más de los que se conocen durante mucho tiempo.

La obtención de la inulina se realiza mediante extracción sólido-líquido utilizando agua como solvente, en este primer paso se consideran las variables de extracción y se determina aquellas que influyen en la extracción de inulina del ajo, la temperatura (30, 55 y 80 [°C]) y la relación agua/ajo (2, 3 y 4[ml agua/g ajo]). El extracto obtenido se purifica mediante carbonatación e intercambio de aniones y cationes. La cuantificación se logra mediante cromatografía líquida de alta resolución permitiendo trabajar con un método de análisis de inulina de detección directa.

Los resultados determinan que el ajo blanco común tiene aproximadamente 18% de inulina en su composición, una cantidad considerable y es la respuesta de que la inulina es uno de los principales componentes del ajo que ayuda en el tratamiento y prevención de diversas enfermedades del organismo.

1. AJO

1.1. Clasificación, origen y descripción de la especie

El ajo, *Allium Sativum*, pertenece taxonómicamente a la familia de las Liliaceae, subfamilia Allioidae. Es originario del centro y sur de Asia, se propagó al área mediterránea y de ahí al resto del mundo. A finales del siglo XV los españoles introdujeron el ajo en el continente americano. Los principales productores son: España, Hungría, República Checa, Italia y Francia, en Europa, y Argentina, México y Estados Unidos, en América.

El ajo pertenece a la clase de las monocotiledóneas. Es una planta herbácea de 30-80 cm de altura, formada por 6 a 12 hojas paralelinervias que engloban un bulbo subterráneo en la parte inferior del tallo. Las flores, de color verde-blancuzco o blanco-rojizo, están agrupadas formando una pseudo-umbrela esférica. Su reproducción es vegetativa, ya que sus flores son estériles. El fruto está constituido por el bulbo, conocido como cabeza de ajo que se encuentra dividido entre 10 a 15 dientes ovoides, oblongos, comprimidos lateralmente y rodeados de una túnica blanquecina. El olor, poco intenso mientras no haya rotura, se desarrolla instantáneamente cuando se corta, siendo fuerte y característico, lo mismo que el sabor.

1.1.1. Hábitat. El ajo es cultivado alrededor del mundo, en las regiones de clima templado y cálido.

- “Suelo: Profundo, fresco, bien drenado. Ligeramente ácido y que no se haya abonado. Aunque se adapta muy bien a la mayoría de los suelos, prefiere suelos francos o arcillosos, ligeramente calizos.
- Cultivo: El ajo es una planta muy rústica ya que se desarrolla en casi todas las zonas de clima templado del mundo. No requiere condiciones climatológicas especiales, aunque sí suele ser un poco más picante en climas fríos. Al principio de su desarrollo soporta bien las bajas temperaturas, pero para un correcto desarrollo requiere temperaturas nocturnas por debajo de los 16° C. Sin embargo, en pleno desarrollo vegetativo soporta temperaturas elevadas, siempre que haya humedad en el suelo.”^[1]

1.2. Química del ajo

El análisis de la composición química del ajo indica una riqueza importante de “glúcidos condensados del tipo de fructosanos, y los glutamin dipéptidos con radicales de azufre. Entre éstos últimos el formado por el ácido glutámico y el sulfóxido de alicisteina denominada aliina. Posee proteínas, su riqueza mineral está constituida por potasio, magnesio, zinc, yodo y dentro del contenido vitamínico se destacan las vitaminas del grupo B y cantidades pequeñas de vitaminas C y E. Además contiene sales de selenio, azúcares, lípidos, saponósidos, terpenos, enzimas, flavonoides y otros compuestos fenólicos. Sin embargo el contenido energético y nutritivo es marginal ya que se consume en muy baja cantidad.”^[2]

“En los extractos de ajo, el tipo y concentración de sustancias extraídas, depende de factores como: grado de madurez, prácticas de producción y cultivo, localización de la planta y condiciones de procesamiento. Así, las propiedades biológicas y las características físico químicas pueden variar de acuerdo a las condiciones de pH (la aliinasa se inactiva en pH ácido), solvente (aumento o disminución de la vida media de la alicina), el almacenamiento tiene influencia sobre el incremento de componentes azufrados. En general los compuestos azufrados generan una gran cantidad de reacciones químicas características, las cuales producen muchos de los efectos metabólicos.”^[3]

La enzima responsable de la transformación bioquímica se denomina aliinasa que se activa al romperse los tejidos del diente de ajo. En el proceso se descompone una molécula de aliina [(+)-S-alil -L-cisteína sulfóxido] dando lugar a una de alicina más dos de ácido pirúvico y dos de amoníaco. La alicina principio activo fundamental se descompone rápidamente debido a la oxidación, por calentamiento o al aire, también es muy inestable en agua. El aroma y sabor característico del ajo se debe a un aceite esencial (0,1-0,2% de esencia en peso) en su composición incluye el disulfuro de alilo, el trisulfuro de alilo y el disulfuro de propilo, el aceite se obtiene por arrastre de vapor no posee propiedades bactericidas o antimicrobianas, pero si propiedades antioxidantes. Las especies de género *Allium* poseen principios activos volátiles que las confieren un aroma y sabor característico. La diferencia entre ellas es la cantidad de radicales metilo o alilo. El ajo posee gran cantidad de radicales alilo proporcionados con cierta proporción de radicales metil-alil. Por ello el ajo no produce cantidad suficiente de principios lacrimales (Tiopropanil sulfóxido), al contrario que la cebolla.”^[4]

En su composición tiene una considerable cantidad de principios azufrados, que puede oscilar entre 500 y 3700 mg/kg de ajo. En resumen la descomposición de la alicina produce:

- “Sulfuros volátiles, principalmente disulfuro de dialilo y sulfuro de alilo
- Ajoenos, entre los que se encuentran tanto el Z como el E-ajoeno y sus derivados metil-ajoeno y dimetil-ajoeno, alicina-ajoeno, trans-ajoeno, cis-ajoeno
- Otros compuestos: heterósidos azufrados, lectinas y alixina, tiosulfatos, cepenos, mono, di, tri y tetrasulfuros, tioles, tiofenos y anhídrido sulfuroso (a partir de los tiosulfatos)”^[5]

“Las vitaminas del ajo fresco se caracterizan por ser rápidamente asimiladas por el organismo. Por otro lado, en su composición se observan muchos e importantes azúcares como la fructosa, la glucosa, la inulina y la arabinosa, así como una notable cantidad de adenosina, ácido nucleico indispensable para la formación del material genético, ADN y ARN, de cualquier ser vivo.”^[6]

“El contenido en alicina está alrededor del 1% y el de aliina del 0.45%.”^[7]

“La cantidad de inulina presente en el ajo varía entre el 15 y 20 %.”^[8]

Cuadro 1. Composición nutritiva del ajo (Por 100 g de producto comestible)

Componente	Unidad	Promedio	Variación
Ingredientes principales			
Agua	g	64	63
Proteínas	g	6,05	
Lípidos	g	0,12	
	g		
Carbohidratos (utilizables)	g	28,41	
Valor Energético	kcal	198.32	
Minerales	g	1,42	
Minerales y elementos traza			
Calcio	mg	38	37-260 150-1000
Manganeso	mg	460	
Hierro	mg	140	
Cobre	mg	149	
Zinc	mg	575	
Níquel	µg	10	
Molibdeno	µg	70	
Aluminio	µg	1,8	
Fósforo	mg	134	
Cloro	mg	30	
Yodo	µg	2,7	
Boro	µg	440	

Continuación del cuadro 1.

Selenio	µg	5,69	4,40-28
Vitaminas	µg	10,9	
E	µg	100	
Total tocoferol	µg	10	
Alfa-tocoferol	µg	90	
B1	µg	200	180-210
B2	µg	80	
Nicotinamida	µg	600	
C	mg	14	9,00-18
Ácidos			
Salicílico	µg	100	
Grasos	µg	500	
Laúrico	mg	24	
Palmítico	mg	Trazas	
Estearico	mg	3	
Oleico	mg	62	
Linoléico	mg	5,5	

Fuente: GARCÍA GÓMEZ, L. Jacinto y SÁNCHEZ-MUNIZ, Francisco J. Revisión: *Efectos cardiovasculares del ajo (Allium Sativum)*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(3), septiembre 2000, 39 p.

1.3. Propiedades del ajo

El ajo ha sido utilizado como medicina natural desde hace siglos. Hasta hoy, los más precisos métodos de análisis en el ajo han encontrado las siguientes aplicaciones medicinales:

- Antibiótico y antimicótico
- Antifebril, estimulante, diurético y expectorante
- Antioxidante
- Previene la hipertensión y la mala circulación
- Disminuye el colesterol y las grasas y favorece la salud del aparato digestivo
- Es una ayuda en casos de encefalitis
- Recomendado en casos de diabetes
- Colabora en la prevención de algunos casos de meningitis
- Es un aliado contra los parásitos intestinales
- Antibacteriano natural.

2. INULINA

La inulina es un polisacárido tipo fructanos, es decir, compuesto por una mezcla de oligómeros y polímeros de unidades de fructosa. Presenta la particularidad de ser muy heterogénea en su grado de polimerización.

“Rose, un científico alemán, aisló por primera vez una "sustancia peculiar de origen vegetal" a partir de *Inula helenium* en 1804, y la sustancia más tarde fue llamado inulina por Thomson (1818). El fisiólogo de plantas, alemán Julius Sachs (1864), fue el pionero en la investigación de fructanos y mediante el uso de solo un microscopio fue capaz de detectar los cristales esféricos de inulina de los tubérculos de *Dahlia*, *Helianthus tuberosus* e *Inula* después de la precipitación con etanol. Los primeros estudios de los efectos de inulina en seres humanos sanos apareció durante el siglo XIX y a principios del siglo XX (Lewis, 1912), mientras que la no toxicidad de inulina se demostró dramáticamente algunos años más tarde (Shannon y Smith, 1935) cuando uno de los autores inyectaron a sí mismo por vía intravenosa con 160 g de inulina. En particular, durante los últimos 10 años ha habido un aumento espectacular en el número de publicaciones relacionadas con los beneficios funcionales y nutricionales de la inulina. Posteriormente, como la inulina ha cambiado de un simple interés científico a un producto industrial con muchas aplicaciones, se produjo una gran estimulación de la investigación relacionada con su producción y uso.”^[9]

2.1. Fuentes de inulina: microorganismos y plantas

Los fructanos se sintetizan de manera natural o artificial a partir de unidades de sacarosa con donadores de fructosa mediante enzimas sacarosa-sacarosa fructosil-transferasa. “Los fructanos se encuentran en un amplio espectro de bacterias de diferentes fisiologías, en un número limitado de hongos y en aproximadamente el 15 % de especies de plantas de floración pertenecientes a las familias monocotiledóneas y dicotiledóneas, especialmente de climas templados y áridos. La síntesis de inulina solo se ha reportado en especies Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* y *Leuconostoc citreum*. Los fructanos producidos por bacterias, son los más largos de la naturaleza, con un grado de polimerización (GP) de 10^4 a 10^6 .

Las especies de hongos que producen fructanos están incluidas básicamente en los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, y *Phytophthora*. Los fructanos sintetizados por hongos consisten en una cadena lineal, cuyo tamaño puede variar entre especies en el mismo género.”^[10]

Los fructanos constituye un importante material de reserva en muchas especies vegetales, presente en más 36000 plantas, generalmente se encuentran en las raíces, tubérculos y rizomas. Abundan en las familias: Liliaceae, Gramineae y Compositae. Una gran parte de las plantas ricas en inulina son comestibles totalmente o en algunas de sus partes, tales como: las raíces de achicoria, el ajo, la cebolla, las alcachofas, los espárragos, el plátano, entre otras. El grado de polimerización varía en función de la especie de planta, las condiciones meteorológicas y la edad fisiológica de la planta.

Cuadro 2. Porcentaje de inulina en peso fresco desde algunas fuentes importantes

Fuente	Inulina (%)
Ajo	15-20
Espárragos	10-15
Salsifí	15-20
Alcachofa de Jerusalem	15-20
Tubérculos de Dalia	15-20
Raíces de Achicoria	15-20

Fuente: Traducido al español de: KAUR, Narinder and GUPTA, Anil K. *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. J. Biosci. 27(7): 703-714, december 2002.

Cuadro 3. Contenido de inulina (% en peso fresco) de plantas que son comúnmente usadas en la nutrición humana.

Fuente	Parte comestible	Contenido de sólidos secos	Contenido de Inulina
Cebolla	Bulbo	6-12	2-6
Alcachofa de Jerusalem	Tubérculo	19-25	14-19
Achicoria	Raíz	20-25	15-20
Puerro	Bulbo	15-20*	3-10
Ajo	Bulbo	40-45*	9-16
Alcachofa	Hojas-corazón	14-16	3-10

Continuación del cuadro 3.

Banana	Fruta	24-26	0.3-0.7
Centeno	Cereal	88-90	0.5-1*
Cebada	Cereal	NA	0.5-1.5*
Diente de león	Hojas	50-55*	12-15
Bardana	Raíces	21-25	2.4-4.0
Camas	Bulbo	31-50	12-22
Mumong	Raíz	25-28	8-13
Yacón	Raíz	13-31	3-19
Salsifí	Raíz	20-22	4-11

NA, dato no disponible

* Valor estimado

Fuente: Traducida al español de: FRANCK, Anne and DE LEENHEER, Leen. *Inulin*. In: *Inulin biopolymers online*. Belgium, 2005. p. 445

2.2. Estructura química

La inulina está formada por cadenas moleculares de fructosa unidas exclusivamente de enlaces $\beta(2 \rightarrow 1)$ fructosil-fructosa. Una unidad de glucosa inicial puede estar presente, pero no es exclusivamente necesario. Fructano es un nombre más general que se utiliza para cualquier compuesto en el que uno o más enlaces fructosil-fructosa constituyen en su estructura (cubre tanto inulina como levano).

Cuando se hace referencia a la definición de inulina, la primera unidad de la cadena (extremo no reductor) puede ser un grupo β -D-glucopiranosil o bien β -D-fructopiranosil.

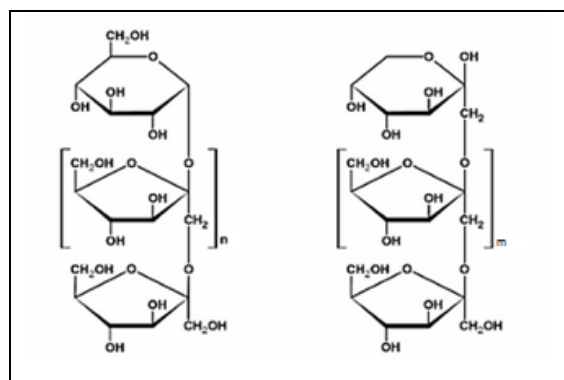


Figura 1. Estructura básica de la inulina: Izquierda, con una molécula terminal de glucosa (β -D-glucopiranosil) GFn. Derecha, con una molécula terminal de fructosa (β -D-fructopiranosil) Fm

El grado de polimerización (GP) de la inulina, así como la presencia de ramificaciones, son propiedades importantes ya que influyen en la funcionalidad de la mayoría de inulinas. Por lo tanto, se hace una distinción estricta entre la inulina de origen vegetal y de origen bacteriano. “El GP de inulina de una planta es bastante baja (máximo 200), mientras que la inulina bacteriana tiene un GP muy alto, puede alcanzar los 100000 o más unidades de fructosa, por otra parte, esta inulina se encuentra muy ramificada ($\geq 15\%$). La inulina procedente de la achicoria, n (el número de unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal) puede variar de 2 a 70. Siendo una mezcla de oligómeros y polímeros. El GP más alto de origen vegetal ha sido encontrado en la alcachofa globo (*Cynara scolymus*) llegando arriba de 200 residuos de fructosa.”^[11]

Los fructanos más destacados derivados de la inulina y de mayor uso industrial es la oligofructosa, obtenidos mediante hidrólisis enzimática de la inulina, y caracterizados por llegar a un GP menor a 10 unidades.

Hasta hace poco, la inulina extraída de las plantas se consideraba como una molécula lineal, pero mediante el uso de análisis de permetilación optimizado fue posible mostrar que incluso la inulina de achicoria nativa (GP 12) tiene un muy pequeño grado de ramificación (1 - 2%), y éste fue también el caso de la inulina de la dalia.

“Desde un punto de vista estructural/polimérico (lineal), la inulina puede ser considerada como una cadena principal de polioxietileno a los que están unidos los restos de fructosa, como una escalera de caracol, es decir, forman una estructura helicoidal. Existen dos formas alomorfas cristalinas de inulina: semi-hidratada e hidratada. La difracción rayos X de muestras sólidas en polvo mostró que la inulina de la forma hidratada (una molécula de agua por unidad de fructosil) cristalina polimórfica es ortorrómbica y la forma semi hidratada (media molécula de agua por unidad de fructosil) es pseudo-hexagonal polimórfica u ortorrómbica consistente en dos hélices paralelas de 6 unidades cada vuelta.”^[12]

2.3. Propiedades

2.3.1. Propiedades físicas y químicas. La inulina no tiene un peso molecular específico, son variables dependiendo de la fuente, pero generalmente oscilan en el intervalo entre 1000 y 5600 Da. Está disponible en forma de polvo, su color varía desde blanco a gris dependiendo del grado de purificación. Prácticamente no tiene olor ni sabor y no tiene efecto residual.

La inulina nativa a diferencia de la inulina de alta pureza (HP), contiene azúcares libres como: glucosa, fructosa, sacarosa, por lo que adquiere cierto dulzor.

La inulina presenta solubilidad en agua, a una temperatura de 10 °C la solubilidad es de 60 g/l y de 330 g/l a 90 °C. Si presenta un alto grado de polimerización es prácticamente insoluble en agua fría. Se aprecia también solubilidad en metanol al 80%, especialmente a 80 °C. La capacidad hidrosoluble de la inulina le otorga propiedades humectantes cuando se emplea como aditivo en productos alimenticios.

La inulina en su estado sólido puro suele presentar formas cristalinas, las cuales suelen ser higroscópicas y difíciles de mantener en forma liofilizada a no ser que se empleen atmósferas controladas. Éstos cristales pueden tener puntos de fusión que van de los 199 °C a los 200 °C cuando se trata de fructanos de bajo grado de polimerización.

Las viscosidades de las soluciones de fructanos son generalmente más altas que las de los demás carbohidratos a la misma concentración y suelen ser de mayor estabilidad. La viscosidad de la oligofructosa a 10 °C en solución acuosa al 5% en peso, es la menor de los fructanos y es una característica clave para la formación de geles y su uso como sustituto de grasas.

Se hidroliza fácilmente por la acción de ácidos o enzimas inulinasas, produciendo un derivado, la oligofructosa comercial que de hecho es obtenida por hidrólisis de inulina cruda.

Suele ser muy estable a rangos de pH 4 y 7, encontrados en la mayoría de los alimentos.

Presenta estabilidad a temperaturas bajas, por ejemplo, a la refrigeración.

Presenta la capacidad de formar geles cremosos cuando se calienta en medios acuosos. Agentes gelantes como gelatina, alginatos, carraginos, gomas y maltodextrinas presentan sinergia con la inulina.

La inulina mejora la estabilidad de emulsiones y espumas.

2.3.2. *Propiedades biológicas.* Gibson y Roberfroid (1995) definen prebiótico como un ingrediente alimentario no digerible que estimula selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un número limitado de bacterias en el colon, mejorando así la salud del individuo. Se aceptan los siguientes criterios para considerar a un alimento prebiótico:

- Debe ser resistente a la acidez gástrica, la hidrólisis intestinal, enzimas digestivas y la absorción gastrointestinal. No debe ser digerible
- Debe ser fermentable
- Que debe de una manera selectiva estimular el crecimiento y/o actividad metabólica de las bacterias intestinales que están asociados con la salud y el bienestar.

Fructanos tipo inulina cumplen con todos estos criterios y se acepta como un alimento prebiótico. Las enzimas digestivas de humanos y animales no tienen la capacidad de hidrolizar la inulina (o sus oligómeros de oligofructosa), por lo que en el transcurso del tracto intestinal permanecen intactos y finalmente son hidrolizados en su totalidad por las bifidobacterias constituyentes del 25% de las bacterias del colon en el intestino grueso, lo que significa que la inulina tiene efecto bifidogénico. Estudios han demostrado que la inulina una vez ingerida entra al colon en una cantidad mayor al 90 %, donde posteriormente son metabolizadas por la microbiota en 55 % de ácidos orgánicos como el ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta (el ácido acético, propiónico y butírico), 35% de biomasa bacteriana, y 10 % de gases (CO₂, H₂, CH₄). Los ácidos y el lactato contribuyen a la energía del metabolismo humano, además son utilizados en parte por las propias bacterias. Estos factores en conjunto explican el bajo valor calórico de la inulina. Al estimular el crecimiento de las bacterias benéficas, con la producción de ácidos grasos de cadena corta disminuyen el pH intestinal permitiendo que sea un lugar no apto para bacterias patógenas, disminuyendo paralelamente sus posibilidades de colonización y translocación, así como algunas enzimas que generan problemas de salud.

“La prevención y reducción de los patógenos se da debido también a la producción de bacteriocinas y otros agentes antimicrobianos, la competencia por sitios de adhesión en las mucosas, la competencia por nutrientes y la producción de inhibidores como el lactato y el acetato (Gibson 2004). Lo anterior es especialmente importante en algunas condiciones tales como la vejez, inmunodepresión, uso de antibióticos o en enfermedades críticas (aguda o crónica, como enfermedades inflamatorias del intestino y cáncer) donde las poblaciones de bifidobacterium y lactobacillus suelen ser más reducidas, evitando consecuentemente una enfermedad sistémica. Por las características descritas a la inulina se le atribuye múltiples beneficios al organismo.

El aumento de butirato en el colon permite la producción de moco, la absorción de iones y la formación de bicarbonato, ejerciendo acciones antiinflamatorias específicas, y está asociado con la producción de mucinas que componen el gel que recubre el epitelio gastrointestinal.

Además inhibe la proliferación del compartimiento de las criptas colónicas, así podría ejercer un papel importante en los mecanismos de defensa contra la carcinogénesis del colon.

Reduce y previene enfermedades de infección como la diarrea y las de inflamación crónica como la colitis ulcerosa, enfermedad de Chron y pouchitis.

Influye en la función intestinal, en el revestimiento de las células epiteliales permitiendo el aumento de volumen de las heces y aumentando el tránsito intestinal. Dosis entre 20-40 g por día de inulina potencian un efecto laxante.

El sistema inmune se fortalece, el aumento de las defensas se debe a las capacidades inmuno modulatorias de las bacterias que crecen a expensas de fructanos, es particularmente evidente en infantes lactantes o en personas de la tercera edad.

Mejora la absorción y acumulación de minerales como el calcio, el magnesio, el zinc, el hierro y el cobre. El aumento de la cantidad de calcio mejora el metabolismo óseo en todas las edades por lo tanto mejoran la salud ósea y permite prevenir enfermedades como la osteoporosis. Al aumentar la absorción de hierro, mejora los niveles de hemoglobina en la sangre, los niveles de sulfuro disminuyen, aquellos producidos por la fermentación de proteínas que imposibilita su absorción, previene la anemia.

El consumo de inulina en cantidades recomendadas y dependiendo del organismo de cada individuo permite un control y hasta una disminución del índice de masa corporal, el peso corporal y la masa grasa del cuerpo. Su aporte calórico es de 1,5 kcal/g a diferencia de los glúcidos digeribles 4 kcal/g.

Estudios a partir de finales de 1990 han demostrado que la fermentación de inulina modifican las señales de las hormonas que implican en el apetito y tienen su origen en el intestino. Esto a su vez puede modular sus niveles en la sangre, afectando el apetito y la ingesta de alimentos

Permite un adecuado equilibrio en el intestino reduce la acumulación de grasas y la inflamación del intestino, regula los niveles de colesterol y de glucosa en la sangre previniendo enfermedades cardiovasculares, diabetes asociada o síndrome metabólico.

Se ha logrado asociar ingestas de 6 a 12 g de inulina diarios durante dos a tres meses con reducciones importantes en el colesterol sérico (hasta de 20-50 dl) (Gilliland y Walker 1990), lo cual va de la mano con una disminución de hasta el 25% en el riesgo de sufrir isquemias, término que en patología morfológica denota la falta total o parcial de sangre en un órgano o parte de él (Universidad Católica de Chile 2006).

Aunque el mecanismo no se comprende completamente, se supone que los oligofructosacáridos hidrosolubles ligan el colesterol y los ácidos biliares en el lumen intestinal aumentando su excreción en las heces.

Tienen la capacidad de disminuir la uremia y la anememia, ya que el nitrógeno amoniacal generado en el colón por diversos procesos, es incorporado a las proteínas de la biomasa bacteriana que crece durante la fermentación, lográndose de esta manera bloquear el paso de este nitrógeno a la sangre.^{»[13]}

2.4. Aceptabilidad intestinal y factores negativos

La inulina y derivados que pasan son considerados fibra dietética soluble pero como toda fibra una ingesta inadecuada puede provocar efectos negativos en el individuo, entre ellos efectos osmóticos, inducidos principalmente por moléculas más pequeñas que aumentan la presencia de agua favoreciendo el tránsito intestinal.

Es aceptable también la producción de gases resultantes de la fermentación bacteriana en el colon. Los compuestos de cadena larga son más fáciles de tolerar que los compuestos de cadena corta, como oligofructosas. La flatulencia es un efecto secundario bien conocido y aceptado a menudo, debido al consumo de fibras dietéticas en general.

Ingestas excesivas de inulina que no sean toleradas por el organismo pueden causar diarreas. No se evidencia ninguna toxicidad sin importar la cantidad ingerida como parte de la dieta. En algunas personas, la rápida fermentación de los fructanos puede provocar una alta concentración de hidrógeno a nivel estomacal, lo que puede promover la peristalsis del colon, lo cual desemboca en sintomatologías similares a la intolerancia a la lactosa tales como defecaciones irregulares, flatulencia e irritabilidad abdominal.

2.5. Aplicaciones

“Las aplicaciones agroindustriales de la inulina es diversa, asociadas directamente a lo nutricional. Los principales usos son como sustitutos no carcinogénicos e hipocalóricos de azúcares edulcorantes como la sucrosa en productos de confitería, chocolatería y bebidas de aceptación sensorial.

En bebidas no gaseosas la adición de pectinas y oligofructosacáridos no afectan negativamente las propiedades sensoriales aún en concentraciones tan altas como un 15% (Freitas y Jackix 2004).

Se los emplea como emuladores y sustitutos de la grasa, debido a que los fructanos hidratados en concentraciones de 40-45%, adoptan una textura y una palatabilidad muy similar a la de la grasa. La tasa de reemplazo equivale a 0.25 g de inulina para emular 1 g de grasa, logrando reducir el contenido energético de 37.6 kJ/g de las grasas al 2.09 kJ/g de la inulina hidratada. Se aplica para alimentos con alto contenido de humedad como heladería, derivados lácteos e incluso embutidos. Las ventajas de ésta sustitución es que se obtiene una palatabilidad, textura y cremosidad idénticas.

Debido a que los oligofructanos no dejan sabores residuales, pueden agregarse a la fibra convencional, sin que involucre en la viscosidad de la mezcla global, aumentando el contenido de fibra en el producto

Estudios realizados por Guven et al. (2005) en yogurt, indican que una cantidad máxima de 1% de inulina en leche descremada es capaz de generar un producto comparable en atributos sensoriales con un yogurt fabricado con leche entera, sin efectos contrarios en la acción de los cultivos lácteos empleados inicialmente en su elaboración.

La inulina es capaz de impedir el crecimiento de cristales de agua en el helado terminado y reducir la pérdida de fluidos. Además mejora la viscosidad y los tiempos de derretido cuando se usa como aditivo en helados, sin que esto involucre algún efecto sensorial negativo (Wouters 1998; Akin 2005).

En el caso de los edulcorantes, la libertad de sustitución es más limitada dado que el dulzor de la inulina es de apenas el 30% del generado por la sacarosa, razón por la cual la sustitución suele ser parcial (Coussement 1999), especialmente con edulcorantes fuertes con los cuales existe por lo general una gran sinergia (Montani 2004).

En la industria de la panificación, la inulina como sustituto de azúcar permite obtener una masa más blanda, presentando mayor esfuerzo mecánica a la mordida.

Al agregar la inulina en las harinas destinadas a la elaboración de pastas, permite un buen índice de hinchamiento y firmeza del producto, con un mejor índice nutricional y un menor índice glicémico reducido en un 15%. Hay que considerar que la inulina a temperaturas entre 135-190 °C empieza a hidrolizarse disminuyendo su cantidad, por lo tanto el procesamiento térmico en esta industria debe tomarse en cuenta.

La inulina también es conocida por su capacidad de estabilizar espumas y emulsiones en su estado hidratado, especialmente cuando se incorpora en un 1- 5% (Murphy 2001; Franck 2002). Además se caracteriza por formar geles acuosos que tienden a ser cada vez menos plásticos a medida que aumenta la concentración de este polisacárido (Botet al. 2004).

Se ha logrado mediante la hidrólisis de la inulina la obtención de fructosa, etanol y 2,3-butanodiol, pero la producción a escala industrial no es competitiva con los métodos tradicionales de producción.

La inulina y sus derivados se utilizan en alimentación animal, permite disminuir malos olores en las heces fecales de animales domésticos.

En la industria farmacéutica, utilizan inulina y sus derivados como material excipiente en tabletas, coadyuvantes en vacunas.

La inulina puede ser ingrediente estructurante en detergentes y actuar como coagulante natural en el tratamiento de aguas residuales.

En la industria química y de procesamiento se usa la inulina y la carboximetil inulina (CMI), como agente quelante y anti-incrustante de tuberías, contenedores, cámaras de reacción y separación y otros equipos.

Ha sido clasificada como material bioactivo, es decir, que es un polímero que puede ser incorporado en empaques de alimentos para dar origen a empaques bioactivos que son materiales que modifican positivamente la funcionalidad de procesos fisiológicos del organismo, como: prebióticos, fotoquímicos y vitamínicos.”^[14]

2.6. Métodos de análisis y cuantificación

Los fructanos tipo inulina tienen propiedades de fibra dietética por lo que la AOAC (Association of Official Agricultural Chemists) apoyó para introducir a los oligosacáridos entre estos los fructanos en la fibra dietética.

Entre 1996 y 1997 se publica el método AOAC 997.08 : “Fructanos en productos alimenticios” un método de cromatografía de intercambio iónico. Luego, se publica el método AOAC 999.03: “Medición total de fructanos en alimentos” un método enzimático/espectrofotométrico.

El método AOAC 997.08 consiste básicamente en que los “fructanos se extraen a partir del producto con agua caliente. Se toma una alícuota del extracto se hidroliza utilizando amiloglucosidasa liofilizada para eliminar el almidón. Parte de la solución hidrolizada se trata con otra enzima inulinasa, se determina los azúcares liberados. Una porción del ensayo inicial y la hidrólisis primera y segunda se analizan mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD). En el extracto inicial se determinan fructosa y sacarosa libre. En la primera hidrólisis enzimática se analiza la suma de glucosa libre y la glucosa de maltodextrina y almidón. En la segunda hidrólisis se analiza la cantidad total de glucosa y la cantidad total de fructosa. Los fructanos se calculan a partir de la glucosa y fructosa.”^[15]

El método AOAC 999.03 consiste básicamente en extraer los “fructanos con agua caliente. Alícuotas del extracto se tratan con una enzima sacarasa específica para hidrolizar la sacarosa en glucosa y fructosa, y con una mezcla de enzimas que degradan el almidón puro hidrolizándolo a glucosa. Todos los azúcares reductores se reducen a alcoholes de azúcar con borohidruro alcalino. Los fructanos se hidrolizan a fructosa y glucosa con fructanasa purificada (exo-inulinasa más endo-inulinasa), y estos azúcares se miden por el método de hidrazida del ácido p-hidroxibenzoico (PAHBAH) para la reducción de azúcares. Espectrofotométricamente.”^[16]

A pesar de que el método estándar AOAC 997.08 resulta muy confiable en sus resultados, su aplicación requiere mucho tiempo y es indispensable el uso de un aparato específico de cromatografía.

Se han establecido varias metodologías para cuantificar fructanos tipo inulina, determinar su peso molecular y el grado de polimerización. Las técnicas utilizadas comúnmente son:

- Cromatografía de gases de alta temperatura (GC)
- Cromatografía en capa fina (TLC)
- Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)
- Cromatografía de permeación en gel (GPC)

3. EXTRACCIÓN SÓLIDO-LÍQUIDO

Es una operación unitaria que consiste en la disolución de un componente (o grupo de componentes) que forman parte de un sólido, empleando un disolvente adecuado en el que es insoluble el resto del sólido. El componente o componentes que se transfieren de la fase sólida a la líquida reciben el nombre de soluto, mientras que el sólido insoluble se denomina inerte.

3.1. Fundamentos

El fundamento es aprovechar diferencias de solubilidad de los sólidos en un determinado disolvente. Es una operación con transporte de masa entre fases.

Para llevar a cabo el proceso es necesario:

- Contacto del disolvente en el sólido a tratar, para disolver el componente soluble o soluto
- Separación de la solución y el resto del sólido con la solución adherida al mismo.

La solución separada se denomina flujo superior o extracto y el sólido inerte acompañado de la solución retenida por el mismo, flujo inferior o refinado. Una unidad de extracción, que recibe el nombre de ideal o teórica cuando la solución correspondiente al extracto, tiene la misma concentración que la retenida por el sólido en el flujo inferior. La transferencia de masa tiene lugar en el sentido sólido-líquido y no se considera el caso inverso.

3.2. Factores que afectan la velocidad de extracción

Los factores que influyen en la velocidad de extracción son los siguientes:

- a) Tamaño de las partículas sólidas. Evidentemente cuanto más pequeñas sean, mayor es la superficie interfásica y más corta la longitud de los poros. Por tanto mayor es la velocidad de transferencia. Sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción por la anulación del área interfásica. Se recomienda realizarlo con sólidos granulados.
- b) Naturaleza del solvente. El líquido debe ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad para que penetre fácilmente en los poros del sólido.

- c) Temperatura. Un aumento de la temperatura incrementa la solubilidad y aumenta los coeficientes de transferencia de materia, por lo tanto una mayor extracción del soluto. El límite superior se fija atendiendo a criterios de calidad del producto, criterios económicos y de seguridad con respecto al disolvente.
- d) Agitación del fluido. Favorece la transferencia por aumento de coeficientes de transferencia de materia en la interfase sólido-líquido. Además se evita la sedimentación y apelmazamiento de las partículas sólidas.

3.3. Curvas de equilibrio

3.3.1. Triángulo rectángulo. Los vértices del triángulo representan componentes puros, en el vértice del ángulo recto el sólido inerte A, en el de la derecha el componente a extraer o soluto B y en el superior el del solvente C. En consecuencia, en el lado AB estarán las mezclas binarias de soluto-sólido inerte, en el lado AC se encuentran las distintas proporciones de inerte y solvente, que son inmiscibles, y en el lado CB estarán localizadas las mezclas soluto solvente, que son miscibles en todas las proporciones. En el interior se representan las mezclas ternarias de los componentes.

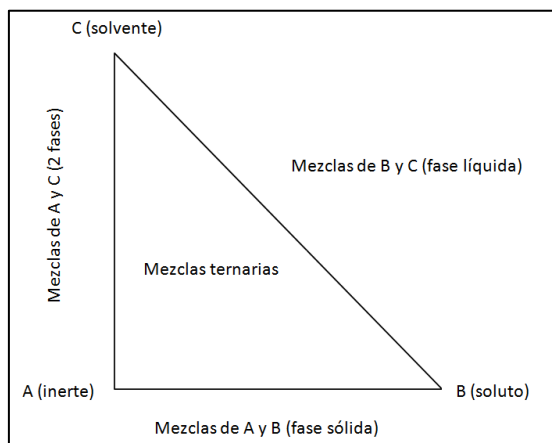


Figura 2. Representación de los componentes en el triángulo rectángulo.

3.3.1.1. Efecto de la saturación. La cantidad de soluto que puede disolverse estará limitada por la saturación de la solución, que será en función de la presión y la temperatura. Prescindiendo del efecto de la presión, solo es apreciable a presiones elevadas, se representan diagramas a una determinada temperatura, en los siguientes casos:

- a) “Cuando el soluto está inicialmente presente como un sólido, la cantidad que de éste puede disolverse en una cantidad dada de solvente está limitado por la solubilidad. Una solución saturada estaría representada por un punto sobre la hipotenusa, como S en el diagrama:

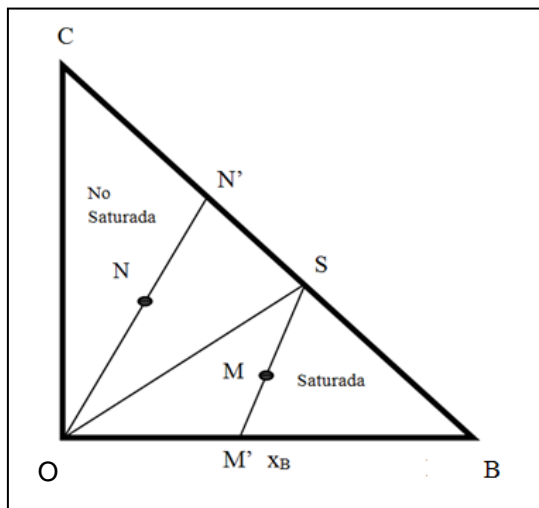


Figura 3. Efecto de la saturación: soluto inicialmente como un sólido

La línea AS representa todas las mezclas posibles de solución saturada y sólido inerte ya que la solución X_B/X_C (fracción de soluto/fracción de solvente) permanece constante a lo largo de esta línea. La región no saturada representa mezclas de soluciones insaturadas y sólido inerte, si una mezcla representado tal como el punto N es separada en fase líquido y sólido, rendiría un sólido inerte de composición tal como O, sea sólido inerte puro, y una solución insaturada de composición tal como N'. La región saturada representa mezclas de sólido inerte, soluto no disuelto y solución saturada, así ni una mezcla representado por el punto M en esta región es separada en dos fases sólido y líquido; obtendríamos una solución saturada de composición S y una fase sólida de composición tal como M'.

- b) Cuando el soluto está presente inicialmente en forma líquida, si el soluto y el solvente son totalmente miscibles en todas las proporciones, todo el triángulo representaría una región insaturada y todos los puntos de la hipotenusa representarían sistemas de una sola fase líquida. Si el soluto y el solvente no son completamente miscibles, el triángulo puede ser dividido en 3 regiones distintas tal como se indica en el diagrama a continuación:

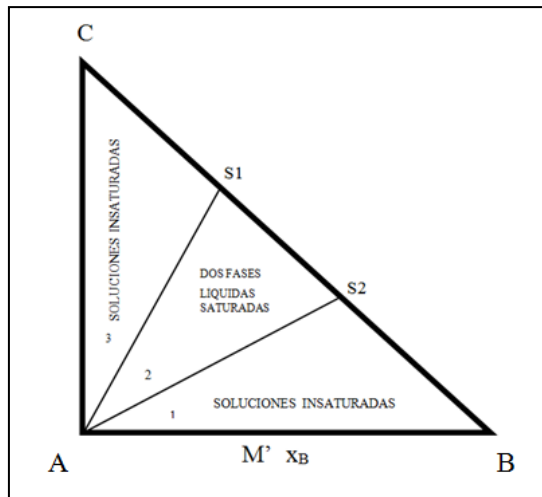


Figura 4. Efecto de la saturación: soluto inicialmente en forma líquida.

3.3.1.2. Flujo inferior o refinado. “Cuando la extracción termina se ha llegado al equilibrio, posteriormente se procede a separar el flujo superior o extracto y el flujo inferior o refinado, la cantidad de solución que quede retenida en el refinado puede ser función de la concentración de la solución, por lo que se considera igual concentración que en el extracto.

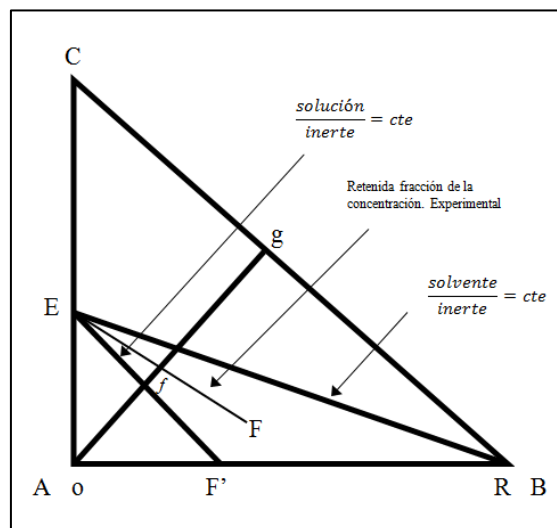


Figura 5. Representación en el diagrama triangular del flujo inferior o refinado.

La línea EF representa la composición del refinado para varias concentraciones, se determina experimentalmente. El punto f sobre esta línea representa una mezcla del sólido puro A en una solución de composición representado por g. La relación of/fg indica la cantidad de solución retenida por el sólido inerte. Si la cantidad de solución retenida en el flujo inferior es independiente de la concentración de la solución, la composición fraccional del flujo inferior con respecto al sólido inerte A está representado por la línea EF' paralela a la hipotenusa, además el punto E representa la composición del refinado cuando la solución está a dilución

infinita, es decir, consiste prácticamente de solvente puro. Si K es la masa de la solución retenida en el flujo inferior por unidad de masa de sólido, la coordenada al punto E está dada por:

$$x_C = \frac{K}{K+1} \quad (1)$$

La ecuación de la línea EF' es por consiguiente:

$$x_C = -x_B + \frac{K}{K+1} \quad (2)$$

Si la relación de solvente o sólido inerte permanece constante, en el flujo inferior, en este caso la línea EF sería una recta que pase a través del vértice R del triángulo, que corresponde a solvente puro B.^[17]

3.3.2. Diagrama rectangular. “Debido a que en el diagrama triangular los datos suelen agruparse hacia un extremo, resultando incómodas las lecturas, es preferible emplear un diagrama rectangular en el que se representa en ordenadas masa de inerte por masa de solución, es decir $\left[\frac{A}{(B+C)}\right]$ y en abscisas masa de soluto por unidad de solución, es decir $\left[\frac{B}{(B+C)}\right]$. En este diagrama, para la sustancia exenta de solvente la ordenada será $\frac{A}{C}$ y la abscisa valdrá la unidad. El solvente puro tendrá un valor de cero en la abscisa y ordenada.

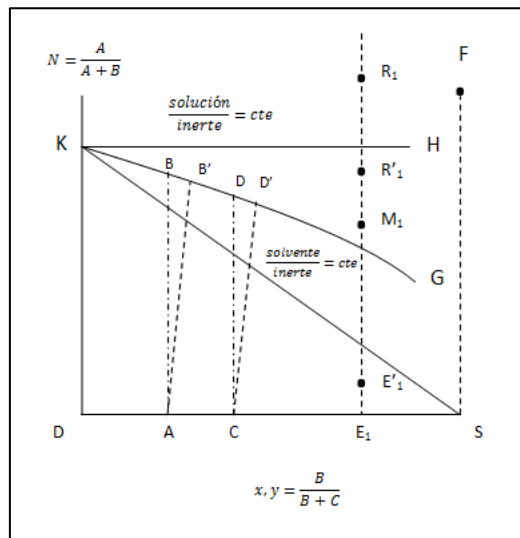


Figura 6. Representación de los componentes en el diagrama rectangular.

Considerando el sólido inerte (del que ha sido extraído todo el soluto) en contacto con la solución (soluto y solvente), el punto representativo de este diagrama será M_1 . Si se deja sedimentar el sistema, la solución que se puede separar vendrá representada por el punto E_1 , y los sedimentos o lodos que contiene el sólido inerte y la solución retenida vendrá representado por el punto R_1 , y la recta E_1R_1 , será una recta de reparto que une los puntos representativos de la solución del flujo superior y de los lodos del flujo interior. Si el sistema no ha sido sedimentado el tiempo suficiente para que pueda separarse una solución clara o si el sólido inerte se disuelve parcialmente, las soluciones pendientes o los flujos superiores estarán representados por los puntos tales como E_1' y los lodos o flujos inferiores por los puntos tales como R_1' .

La solución retenida por unidad de sólido inerte vendrá representada por la curva KG , que ha de determinarse experimentalmente. Si la solución retenida por unidad de sólido inerte y constante e independiente de la concentración el lugar geométrico de la mezcla sólido inerte, y solución retenida será una recta paralela al eje de abscisas (recta KH). Si lo que permanece constante es la relación solvente/sólido inerte el lugar geométrico de las mezclas sólido inerte y solución retenida, vendrá dada por la recta HS que pasa por el punto cuyo abscisa representa la composición de la solución retenida por el sólido inerte.

Cuando todo el sólido está en la solución y la solución retenida por el sólido inerte tiene la misma composición. La composición del flujo superior, las rectas tales como AB , CD , etc., representan rectas ideales de reparto que pasan perpendiculares al eje de las abscisas. Cuando no se alcanzan estas condiciones, las rectas de reparto serán AB' , CD' , etc., en lo que los puntos B' , D' , etc., estarán a la derecha de B , D , etc.” [18]

3.4. Métodos de cálculo: contacto sencillo



Figura 7. Esquema de flujo para extracción sólido-líquido en contacto sencillo

Se trata de una operación discontinua que consiste en poner en contacto íntimo toda la alimentación en todo el solvente a emplear separando luego la solución formada del sólido en el que queda la solución retenida.

La representación de los diferentes corrientes sobre el diagrama triangular es la siguiente, con el balance de masa respectivo:

$$F + S = M = E_1 + R_1 \quad (3)$$

$$FX_F + SY_0 = MX_M = E_1Y_1 + R_1X_1 \quad (4)$$

$$X_M = \frac{FX_F + SY_0}{F + S} \quad (5)$$

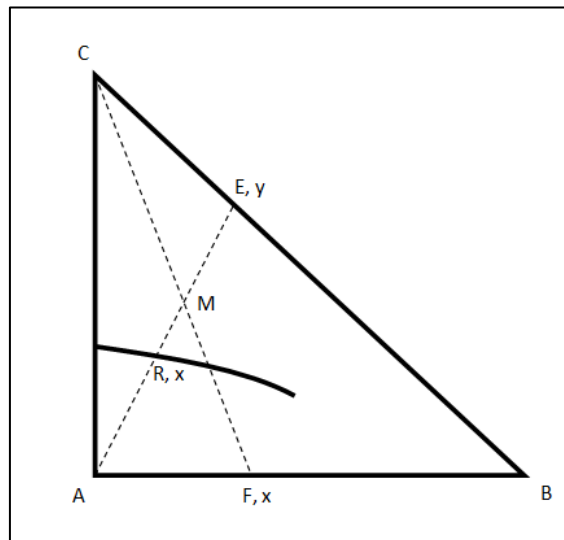


Figura 8. Representación de las concentraciones de las corrientes de la extracción sólido-líquido en contacto sencillo.

3.5. Transferencia de masa

“La velocidad de transferencia de masa dentro del residuo poroso es difícil de evaluar, dado que no es posible definir la forma de los canales a través de los cuales la transferencia se llevara a cabo. Es posible, sin embargo, para obtener una indicación aproximada de la tasa de transferencia de las partículas a la mayor parte del líquido. Utilizando el concepto de una

película delgada de proporcionar resistencia a la transferencia, la ecuación de transferencia de masa se puede escribir como:

$$\frac{dM}{dt} = \frac{k'A(c_s - c)}{b} \quad (6)$$

donde:

A es el área de la interfase sólido-líquido,

b es el espesor efectivo del líquido que rodea las partículas de la película,

c es la concentración del soluto en la masa de la solución en el tiempo t,

c_s es la concentración de la solución saturada en contacto con las partículas,

M es la masa de soluto transferido en el tiempo t, y

k es el coeficiente de difusión.

Para que un proceso por lotes en el que V, el volumen total de la solución se asume que se mantiene constante, entonces:

$$dM = Vdc \quad (7)$$

$$\frac{dc}{dt} = \frac{k'A(c_s - c)}{bV} \quad (8)$$

El tiempo t que tarda la concentración c alcanzada de la solución a partir de la concentración inicial c_o , considerando que b y A permanecen constantes, es encontrado por la integración:

$$\int_{c_o}^c \frac{dc}{c_s - c} = \int \frac{k'A}{bV} dt \quad (9)$$

$$\ln \frac{c_s - c_o}{c_s - c} = \frac{k'A}{bV} t \quad (10)$$

El solvente puro es inicialmente usado, $c_o = 0$, y:

$$1 - \frac{c}{c_s} = e^{-\left(\frac{k'A}{bV}\right)t} \quad (11)$$

$$C = c_s \left(1 - e^{-\left(\frac{k'A}{bV}\right)t}\right) \quad (12)$$

La solución se satura con tendencia exponencial. En la mayoría de los casos el área interfásica tiende a aumentar durante la extracción, y cuando el material soluble forma una proporción muy alta de sólido, puede ocurrir una desintegración total y completa de las partículas. Aunque esto se traduce en un aumento del área interfásica, la tasa de extracción probablemente se reducirá, debido a que el libre flujo del disolvente se vería obstaculizado y el valor efectivo de b se incrementaría.^{»[19]}

4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

La cromatografía es un método físico empleado para la separación, identificación y cuantificación de numerosas sustancias. Se fundamenta en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. En cromatografía líquida, la fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase fija o estacionaria.

La cromatografía líquida es realizada en una columna de vidrio, que contiene la fase estacionaria en su interior, luego de colocar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad.

En la actualidad, con el avance en ciencia y tecnología se ha realizado modificaciones en la fase estacionaria disminuyendo el tamaño de partículas a micrones, aumentando la eficiencia de las separaciones, desarrollando un equipo para trabajar a altas presiones para que fluya la fase móvil, denominando a la técnica cromatografía líquida de alta resolución. El HPLC es ampliamente utilizado, proporcionando gran sensibilidad con determinaciones cuantitativas exactas; permite analizar múltiples compuestos como aminoácidos, carbohidratos, fármacos, terpenoides, plaguicidas, drogas, antibióticos, esteroides, vitaminas, alcoholes entre otros.

4.1. Componentes del HPLC

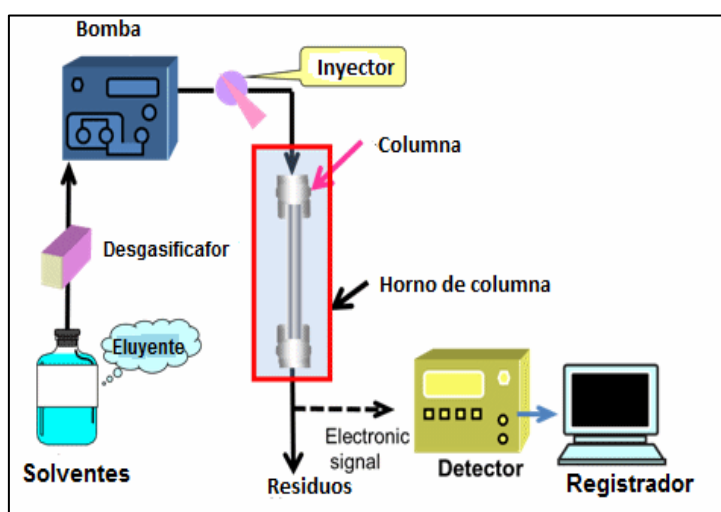


Figura 9. Componentes principales del HPLC

Los componentes básicos de un sistema de HPLC son: la bomba, el inyector, la columna de separación, el detector y el registrador de datos.

4.1.1. Reservorios de la fase móvil. Consisten en recipientes de vidrio o acero inoxidable de entre 200 ml y 1000 ml. Las conexiones que son tuberías de plástico tienen un filtro adosado al extremo de poros de entre 0,22 μm a 0,45 μm , de esta manera se evita que ingresen al sistema impurezas en el solvente.

Es indispensable que no ingrese aire al HPLC, por lo se debe desgasificar la fase móvil y evitar que el equipo se dañe o que genere ruidos en el detector dando información errónea de los resultados.

La elección de la fase móvil tiene que ser acorde con el tipo de cromatografía utilizada y cumplir con las siguientes condiciones:

- Debe presentar solubilidad con la muestra
- Ser de alta pureza o de grado HPLC del 99.99%. En el caso de poseer impurezas taponará la columna de análisis que está compuesta de partículas de diámetros pequeños, provocando su destrucción
- Poseer baja viscosidad para su fácil desplazamiento a través del equipo
- Que no reaccione con la muestra.

4.1.2. Sistema de bombeo. La bomba es el principal componente del sistema, permite movilizar la fase móvil de forma controlada y precisa de acuerdo al flujo deseado. La variación de la velocidad de flujo influye directamente en los análisis, por lo que se requieren bombas con una alta sensibilidad a los cambios. Generalmente se encuentran bombas neumáticas y de motor eléctrico.

Sistemas de mezcla de fase móvil.- El grado de desplazamiento y separación de los componentes contenidos en la muestra depende de las interacciones químicas entre la fase móvil, la muestra y la fase estacionaria. Si existe una fuerte interacción de componentes con la fase móvil que con la fase estacionaria eluirán más rápido de la columna obteniéndose tiempo de retenciones pequeños.

La fase móvil puede manejarse de distintas maneras en el transcurso del análisis de la siguiente manera:

- Elución isocrática: la composición de la fase móvil permanece constante durante todo el análisis de cada muestra
- Elución por gradiente: la composición de la fase móvil varía conforme se realiza el análisis, se va incrementando en la fase orgánica. Se puede variar propiedades como fuerza iónica, pH, constante dieléctrica y otras
- Elución politípica: se combinan técnicas de elución.

Generalmente, de acuerdo al análisis que se desee realizar, en gradiente permite mejorar la eficiencia de la separación, acelerando o retrasando la salida de determinados picos.

En los equipos de HPLC existen generalmente tres tipos de bombas:

- Bomba recíproca o pistón
- Bomba tipo jeringa o de desplazamiento
- Bomba neumática o de presión constante.

El sistema de bombeo debe cumplir determinadas condiciones para poder ser utilizados en equipos HPLC:

- Poder generar presiones de hasta 400 atmósferas
- Tener una salida libre de pulsos
- Poder manejar caudales de entre 0,1 ml/min y 10 ml/min
- Control de flujo con alta reproducibilidad (variación máxima del 0,5%)
- Estar construido de elementos resistentes a la corrosión, ya sea teflón o acero inoxidable.

4.1.3. Sistema de inyección. A continuación de la bomba está el inyector, es una válvula que permite introducir la muestra en la fase móvil, regulando la cantidad en volumen requerido para el análisis. Fundamentalmente existen dos tipos de inyectores manuales: los de jeringa y los de válvula.

- Inyectores de jeringa. En este tipo de inyectores, la introducción de la muestra en la columna se realiza por medio de una jeringa cuya aguja entra en el sistema cromatográfico a través de una membrana lo que permite depositar la muestra en la cabeza de la columna. Las ventajas de este tipo de inyector, radican en su facilidad de construcción y en que permiten sacar todo el partido a la eficacia ofrecida por la columna; por el contrario, son inyectores que presentan una gran falta de reproducibilidad, tienen una presión de trabajo limitada y son de gran dificultad de manejo.

- **Inyectores de válvula.** Éste sistema basado en lazos de muestreo consiste en una válvula de seis vías, dos de las cuales están conectadas entre sí por medio de una espira. Esta espira es un tubo de volumen conocido, cuya misión es la de contener la muestra antes de efectuarse la inyección. La introducción de la muestra se lleva a cabo en dos etapas: la primera se realiza a presión atmosférica, y consiste en cargar la muestra en la espira con ayuda de una jeringa; en la segunda, mediante un giro de la válvula, se hace pasar el eluyente a través de la espira hacia la columna

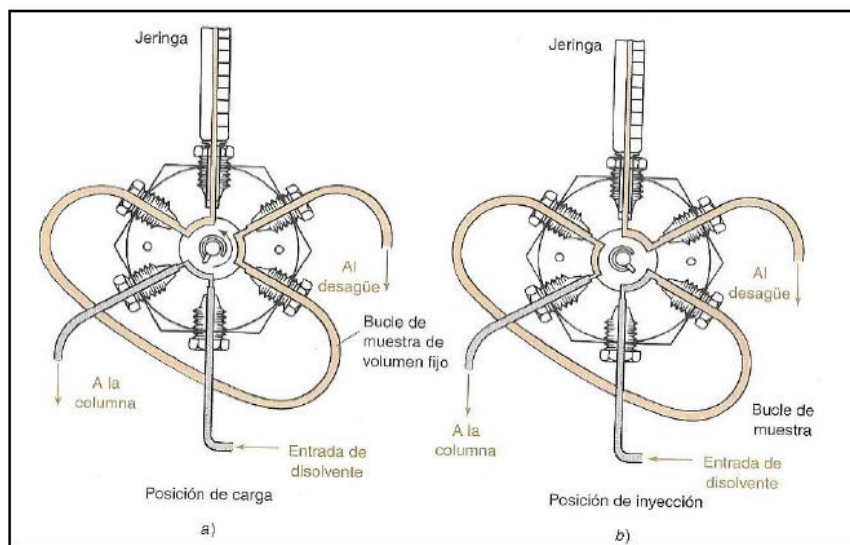


Figura 10. Sistema de inyección basado en lazos de muestreo.

4.1.4. Columna. Parte fundamental de un sistema de cromatografía de líquidos, debido a que en su interior se lleva a cabo la separación a través del relleno que lo contiene, de tal manera que resulta indispensable una correcta elección de la columna para cada análisis. Las columnas generalmente son de acero inoxidable y para análisis de algunos analitos como biomoléculas y compuestos iónicos, son cubiertas de poliéter éter cetona, son pre-armadas de entre 10 y 30 cm de longitud, el diámetro interior varía entre 4 y 10 mm y el de las partículas de relleno, es decir, la fase estacionaria entre 3 y 10 μm .

En la actualidad, también se encuentran columnas de pequeños diámetros y grandes longitudes que permiten reducir el consumo de solvente y facilitan la posibilidad de acoplar a la cromatografía líquida con otras técnicas analíticas. Además existen columnas más sofisticadas, ya que tienen químicamente adherida la fase estacionaria al tubo, lo que hace innecesario la utilización de rellenos.

La capacidad de separación de la columna está influenciada por las siguientes características: diámetro interno, longitud, conexiones, relleno y tamaño de la partícula del relleno.

4.1.5. *Detector.* Los detectores tienen la función de monitorear en tiempo real la salida de solutos de la columna cromatográfica, generando una señal eléctrica proporcional al nivel de alguna propiedad de la fase móvil los solutos que eluyen.

Se dividen en dos grandes categorías:

- Detectores de propiedades masivas: detectan propiedades como el índice de refracción, constante dieléctrica o densidad de la fase móvil (varía según la cantidad de soluto)
- Detectores de propiedades del soluto: detecta concentraciones a partir de la absorbancia, fluorescencia o corriente de difusión. Este tipo de detectores son mil o más veces sensibles que el primer tipo.

Los sistemas de detección más utilizados son:

- Detectores de absorbancia: ultravioleta, visible y rango espectral continuo
- Índice de refracción
- Dispersión de luz evaporativo
- Espectrómetro de masas
- Conductividad
- Fluorescencia
- Quimioluminiscencia
- Rotación óptica
- Electroquímico

4.1.6. *Registrador de datos.* El resultado de la separación por un detector es una señal electrónica que para ser registrada se necesita de un procesador de datos. Un ordenador es utilizado comúnmente para procesar y almacenar los datos de los análisis realizados. También una computadora personal es de utilidad. Existen programas específicos para cromatografía líquida que permiten corregir la línea base, cálculos automáticos de la concentración, determinación del peso molecular, entre otros.

4.2. Calibración del cromatógrafo

El pico cromatográfico es una distribución de las moléculas que eluyen a través del tiempo. La cuantificación del pico representa concentración, por lo tanto determina la cantidad de moléculas del soluto.

4.2.1. Método de la recta de calibrado. Es un método sencillo y fiable que consiste en preparar una serie de soluciones de concentración conocida de la sustancia que se va a analizar, con la particularidad que tienen que ser de máxima pureza. Las soluciones patrón son inyectadas bajo las mismas condiciones cromatográficas con las que se determinará la muestra. El análisis cuantitativo se fundamenta en la comparación de áreas o alturas del pico en función de la concentración. La representación gráfica de los datos, relacionando el área del pico con la masa del componente debe representar una línea recta que pasa por el origen de coordenadas, llamada recta de calibración. Es necesario realizar varias veces la calibración del equipo, no es única, ya sea que se realice la medición del mismo analito.

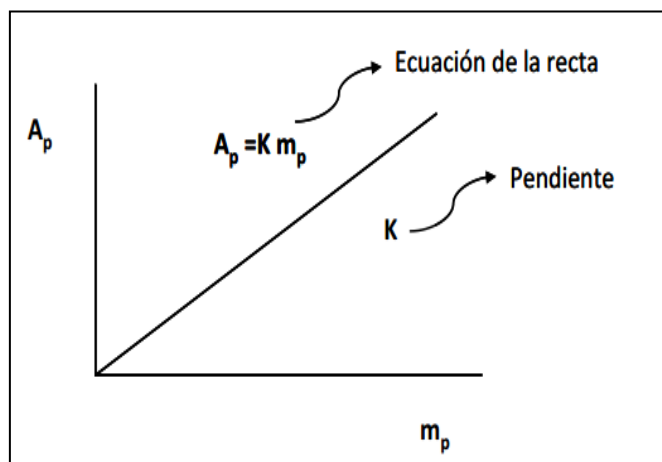


Figura 11. Recta de calibración directa

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Metodología

El trabajo se desarrolla con la Investigación Experimental utilizando como base la Investigación Bibliográfica.

5.1.1. Diseño experimental. La inulina se obtiene mediante extracción sólido-líquido en contacto sencillo, se consideran los factores que afectan la velocidad de extracción: solvente, tamaño de la partícula, relación solvente/ajo, temperatura, agitación y tiempo de extracción. Los factores se analizan y se comprueba su influencia en la extracción de inulina del ajo, por lo tanto la cantidad de inulina extraída estará en función de la temperatura y de la relación solvente/ajo. El resto de parámetros quedan establecidos con criterio, resultado de la investigación bibliográfica y las pruebas en el laboratorio.

El solvente utilizado es agua. La relación agua/ajo variará con valores de: 2, 3, 4 [ml agua/g Ajo]. Las variaciones de temperaturas de extracción son: 30, 55, 80 [°C]

La combinación de las variables de proceso se presenta en el siguiente esquema:

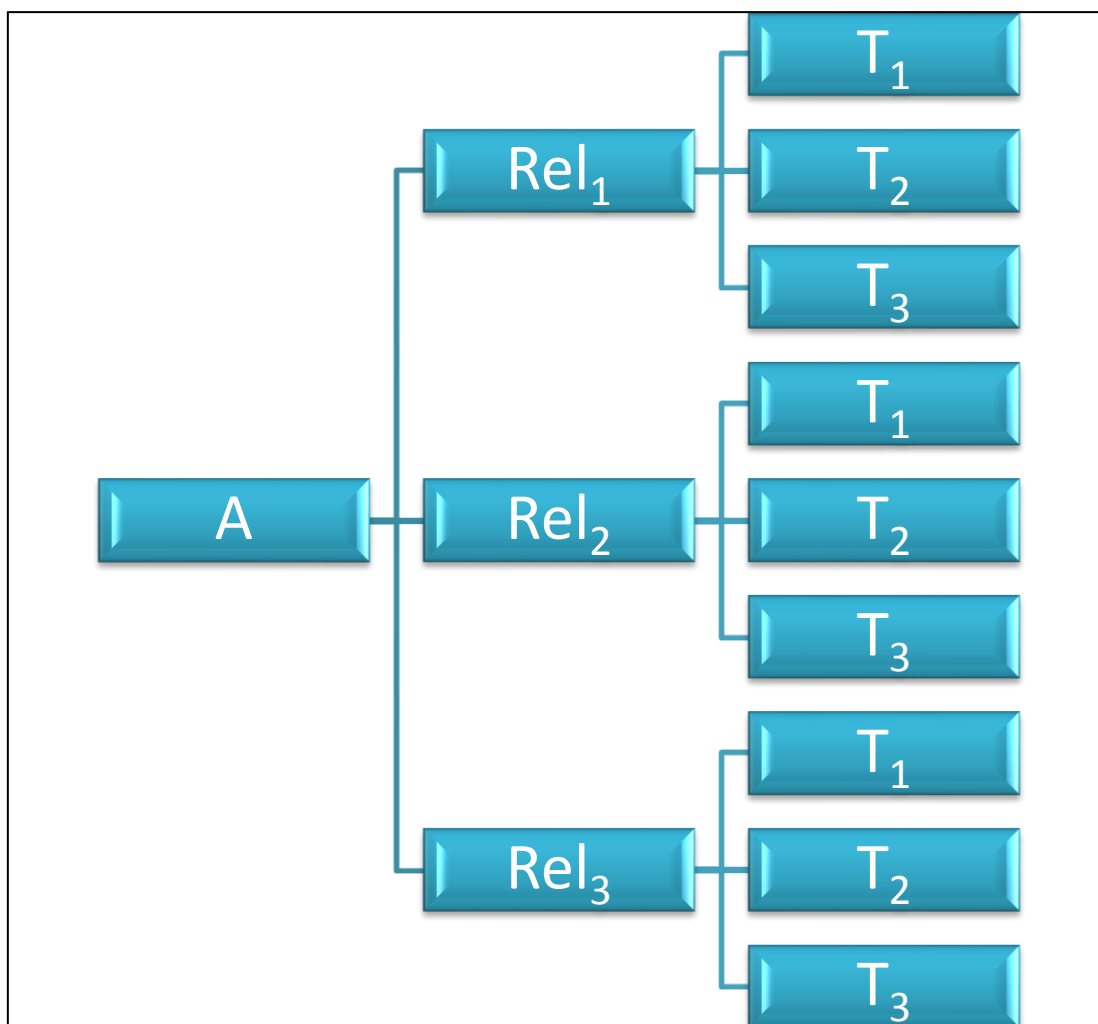


Figura 12. Esquema de las experimentaciones obtenidas con la combinación de las variables de proceso.

donde:

A: Cantidad de ajo utilizada para la extracción

Rel: Relación de agua/ajo

T: Temperatura de trabajo

Los extractos de cada combinación entran a dos etapas de purificación para finalmente cuantificar la inulina mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Se realiza una réplica de cada experimento básico.

5.1.2. Preparación del cromatógrafo. El cromatógrafo y el detector antes de ser utilizados deben ser acondicionados y equilibrados de acuerdo al tipo de análisis que se va a realizar, por lo tanto debe ser considerado fundamental conjuntamente con la extracción.

Para realizar la cuantificación se requiere del método de análisis y de la curva de calibración, ambas características están en función de la muestra que se va a ingresar y de la columna que se va a utilizar. El método de análisis considera parámetros como: flujo, temperatura del detector, temperatura de la columna, modo de bombeo, etc.

Utilizando estándares de inulina, se comprueba si el método de análisis determinado es correcto, es decir, si el cromatograma obtenido es legible y permite obtener un pico con buena resolución en un tiempo de retención ideal. La calibración se realiza ingresando al HPLC diferentes concentraciones de inulina de alta pureza utilizando el método de análisis establecido, de ésta manera es posible medir inulina de cualquier muestra.

5.2. Sustancias y reactivos

- Ajo blanco común
- Agua Tipo 1 $\text{H}_2\text{O}_{(l)}$
- Alcohol potable $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}_{(sln)}$ 50%
- Hidróxido de calcio $\text{Ca}(\text{OH})_{2(sln)}$ 0.1 M
- Ácido clorhídrico $\text{HCl}_{(sln)}$ 1N, 5% v/v
- Hidróxido de sodio $\text{NaOH}_{(sln)}$ 3% p/v
- Inulina BERNEO HP

5.3. Materiales y equipos

- | | | |
|-------------------------------------|--------------|-------------------|
| • Vasos de precipitación de 100 ml | A= [± 10 ml] | |
| • Vasos de precipitación de 1000 ml | A=[± 100 ml] | |
| • Vasos de precipitación de 1500 ml | A=[± 500 ml] | |
| • Probeta de 10 ml | A=[± 0,1 ml] | |
| • Probeta de 50 ml | A=[± 1 ml] | |
| • Probeta de 250 ml | A=[± 2 ml] | |
| • Termómetro digital | A=[± 0,1 °C] | R= -50 a + 300 °C |
| • Termómetro de mercurio | A=[± 1 °C] | R= -20 a + 110 °C |
| • Agitador mecánico | A=[192 rpm] | R= 280 – 2800 rpm |
| • Balanza de precisión | A=[0,1 g] | R= 0 – 1500 g |
| • Balanza analítica | A=[0,0001 g] | R= 0 – 320 g |
| • Picnómetro de 25 ml | | |

- Balones aforados de 100 ml y 1000 ml
- Triturador
- Baño térmico
- Estufa
- Medidor de pH
- Papel filtro
- Intercambiador de iones
- Sistema de filtración a vacío
- Equipo de ultrasonido
- Cromatógrafo líquido de alta resolución WATERS Alliance e2695 con Detector de índice de refracción (IR) 2414
- Membranas de filtración
- Filtros para jeringas
- Jeringas
- Viales
- Columna SHODEX SUGAR KS-806

5.4. Procedimiento

5.4.1. *Procedimiento para determinar la humedad del ajo*

- Seleccionar y lavar los bulbos de ajo. Cortar la parte del tallo madre de manera que se obtenga una muestra homogénea.
- Triturar los bulbos hasta un tamaño de partícula aproximadamente 4 mm.
- Medir 100 g de ajo y secarla en la estufa a 70°C durante 24 horas.
- Medir la masa seca de ajo.
- Repetir el procedimiento cinco veces.

5.4.2. *Procedimiento de la extracción de inulina del ajo*

- Preparar la materia prima: seleccionar, lavar y desinfectar con etanol los bulbos de ajo. A continuación cortar la parte del tallo madre de manera que quede una muestra homogénea y triturar los bulbos hasta obtener un tamaño de partícula (t_p) aproximadamente de 4mm.

- Extraer la inulina del ajo: medir 200 g de ajo y trabajar con la combinación de las variables relación agua/ajo y temperatura de acuerdo al diseño experimental establecido. Para cada combinación se establece un tiempo de extracción de 45 min con agitación constante $\alpha = 280$ rpm.
- Medir la temperatura del ambiente.
- Filtrar el extracto de ajo y medir el volumen. Medir la masa del refinado dejarlo secar por 24 horas a 80°C y medir la masa de la torta seca.

5.4.3. Procedimiento de la purificación del extracto. La purificación del extracto se realiza para eliminar ciertos componentes del ajo distintos de la inulina. En una primera etapa de purificación mediante carbonatación se eliminarán ciertos componentes como grasas, proteínas, algunos aniones como fosfatos y coloides. Una segunda etapa de purificación consistirá en eliminar cationes y aniones restantes mediante intercambio de iones. El extracto obtenido se trata siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

- Subir el pH del extracto a 10,2 con una solución de hidróxido de calcio Ca(OH)_2 0,1 M, a una temperatura de 60°C y dejar con agitación constante a 280 rpm durante 30 minutos.
- Disminuir el pH de la mezcla obtenida a 8 con una solución de ácido clorhídrico 1 N.
- Filtrar la mezcla y medir la masa de torta húmeda de la primera etapa de purificación, dejarla secar por 8 h a 70°C y medir la masa de la torta seca.
- Pasar la solución obtenida por las columnas de intercambio catiónico y aniónico y medir el volumen del extracto purificado.

Las columnas de intercambio iónico una vez saturadas deben regenerarse. Las resinas catiónicas se regeneran con una solución de HCl al 5% v/v y las resinas aniónicas se regeneran con una solución de NaOH al 3% p/v.

5.4.4. Procedimiento de la cuantificación de inulina en el HPLC. El manejo del HPLC implica trabajar con precaución antes, durante y después del análisis de inulina para obtener los resultados correctos:

- Preparar la fase móvil: Limpiar y desinfectar el envase correspondiente, filtrar el agua tipo 1 a través del filtro membrana de 0,45 μm , degasificar con el equipo de ultrasonido durante 10 min y colocarlo en el reservorio cuidadosamente.
- Encender el equipo y acondicionarlo: realizar las limpiezas de sellos y agujas, en seco y húmedo y las purgas de inyector.

- Colocar la columna SHODEX KS-806 en el horno del equipo.
- Ingresar las condiciones del método de inulina:
 Temperatura del detector: 40°C
 Temperatura de la columna: 80 °C
 Flujo de la fase móvil: 1.2 ml/min
- Realizar la purga en el detector IR y equilibrar todo el sistema durante una hora.
- Para calibrar el equipo: preparar soluciones estándar de inulina BERNEO HP (99.9%) en concentraciones de 1%, 2%, 3%, 4%, 5% y 6% p/v.
- Colocar las soluciones estándar en los viales a través de los filtros de 0,45 µm con ayuda de las jeringuillas.
- Se realizarán 3 mediciones de inulina por cada experimentación, es decir, por cada combinación de las variables de proceso, colocar las muestras de extracto purificado en los viales a través de los filtros de 0,45 µm.
- Programar la secuencia de mediciones iniciando con los estándares y luego con el análisis de inulina de las muestras obtenidas.
- Procesar los datos obtenidos y determinar la cantidad de inulina contenida en el extracto purificado.

5.5. Diagrama de flujo del procedimiento de extracción y cuantificación de inulina del ajo

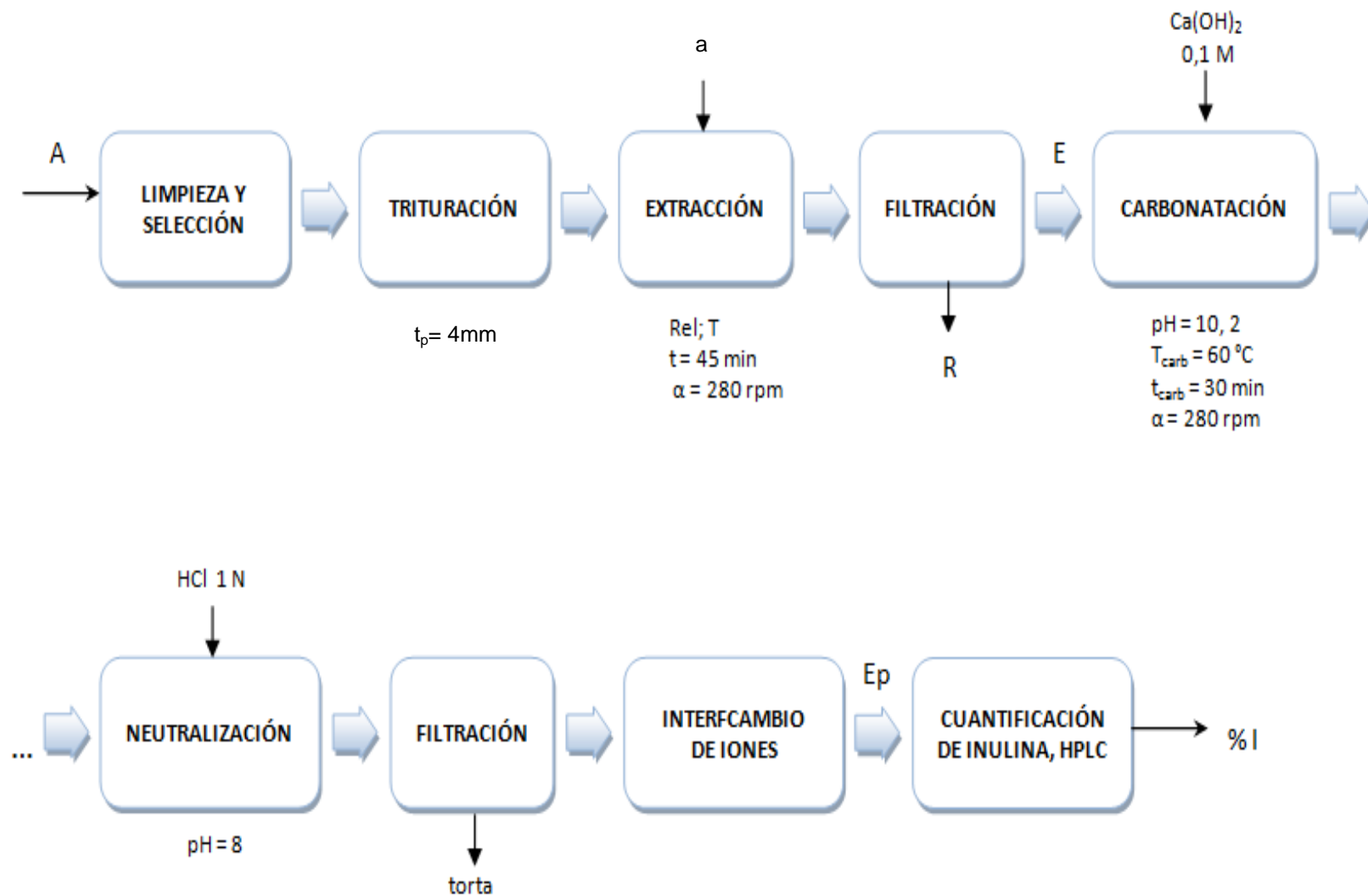


Figura 13. Diagrama de flujo de la extracción y cuantificación de inulina del ajo

5.6. Datos experimentales

5.6.1. Datos de masa húmeda y seca de ajo para cuantificar humedad

Tabla 1. Masas de ajo para cuantificar humedad

A, g	msa, g
100	29,0813
	28,9543
	29,1345
	29,0432
	28,9345

donde:

A: Cantidad de ajo, [g]

msa: Masa seca de ajo, [g]

5.6.2. Datos de la extracción de inulina del ajo

Tabla 2. Extracción de inulina a T = 30°C

N	A, g		a, ml		E, ml		T _{amb} °C		R, g		mts, g	
	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
1	200,00		800,00		764,00	768,00	21,00	20,00	209,30	207,60	32,40	31,90
2			600,00		570,00	568,50	19,00	21,00	207,10	204,20	35,40	35,20
3			400,00		376,00	371,40	23,00	19,00	195,20	194,50	37,50	38,10

Tabla 3. Extracción de inulina a T = 55°C

N	A, g		a, ml		E, ml		T _{amb} , °C		R, g		mts, g	
	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
1	200,00		800,00		746,00	746,00	20,00	20,00	166,60	169,30	18,40	19,30
2			600,00		570,00	570,00	20,00	19,00	178,00	172,40	22,00	21,40
3			400,00		352,00	352,00	24,00	22,00	182,80	180,50	27,40	26,80

Tabla 4. Extracción de inulina a T = 80°C

N	A, g		a, ml		E, ml		T _{amb} , °C		R, g		mts, g	
	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
1	200,00		800,00		627,00	630,50	19,00	20,00	157,20	154,60	16,90	17,10
2			600,00		509,00	504,60	21,00	19,00	161,20	164,60	21,30	20,90
3			400,00		329,00	331,00	22,00	21,00	169,70	174,20	25,60	24,90

donde:

A : Cantidad de ajo para la extracción, [g]

a : Volumen de agua, [ml]

E : Extracto, [ml]

T_{amb} : Temperatura ambiente, [°C]

R: Refinado, [g]

mts: Masa torta seca, [g]

e : Experimento básico

r : Réplica

Las asignación de e y r, es decir, de experimento básico y la réplica se realizan en todas las experimentaciones y cálculos.

5.6.3. Datos de la purificación del extracto del ajo (E)

Tabla 5. Purificación del extracto a T= 30 °C

N	T _{amb} , °C		mthp, g		mtsp,g		Ep, ml	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	21,00	20,00	13,74	13,12	1,03	1,02	1100,00	1120,00
2	19,00	21,00	9,27	9,00	1,45	1,48	910,00	900,00
3	23,00	19,00	8,31	7,98	1,37	1,35	600,00	648,00

Tabla 6. Purificación del extracto a T= 55 °C

N	T _{amb} , °C		mthp, g		mtsp,g		Ep, ml	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	20,00	20,00	21,64	20,96	1,65	1,59	1090,00	1105,80
2	20,00	19,00	19,35	19,49	2,10	1,99	890,00	895,00
3	24,00	22,00	12,57	13,03	2,19	2,20	618,40	606,50

Tabla 7. Purificación del extracto a T= 80 °C

N	T _{amb} , °C		mthp, g		mtsp,g		Ep, ml	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	19,00	20,00	22,59	21,49	1,91	1,93	980,00	990,00
2	21,00	19,00	20,80	19,85	2,65	2,55	878,00	880,00
3	22,00	21,00	17,43	16,98	2,74	2,75	635,70	638,00

donde:

mthp: Masa torta húmeda en la purificación primaria, [g]

mtsp : Masa de torta seca en la purificación primaria, [g]

Ep : Extracto purificado, [ml]

5.6.4. Datos de la cuantificación de inulina en el extracto purificado.

Tabla 8. Cuantificación de inulina a T= 30 °C

N	Ep, ml		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	1100,000	1120,000	18,904	19,124	18,910	19,025	18,838	19,125
2	910,000	900,000	21,530	21,987	21,433	22,012	21,445	22,047
3	600,000	648,000	24,131	23,847	24,205	23,847	23,867	23,687

Tabla 9. Cuantificación de inulina a T= 55 °C

N	Ep, ml		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	1090,000	1105,800	27,797	26,900	27,799	26,900	27,622	26,900
2	890,000	895,000	30,912	29,984	30,945	29,978	31,000	29,897
3	618,400	606,500	35,715	36,124	35,382	36,145	35,068	36,187

Tabla 10. Cuantificación de inulina a T= 80 °C

N	Ep, ml		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep	
	e	r	e	r	e	r	e	r
1	980,000	990,000	31,219	30,987	31,224	30,968	31,206	31,054
2	878,000	880,000	34,154	33,879	34,050	33,878	34,062	33,975
3	635,700	638,000	35,946	36,145	35,946	36,158	35,946	36,102

donde:

$HPLC_1$: Concentración de la primera medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

$HPLC_2$: Concentración de la segunda medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

$HPLC_3$: Concentración de la tercera medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

I: Inulina

5.6.5. Datos adicionales

Tabla 11. Densidad del agua

T, °C	ρ , g/ml
19,0000	0,9984
20,0000	0,9982
21,0000	0,9980
22,0000	0,9978
23,0000	0,9975
24,0000	0,9973

Fuente: PERRY, Robert H; GREEN, Don W. y MALONEY, James O. *Perry Manual del Ingeniero Químico*. Tercera Edición, Mc-Graw Hill, México, s.f., p 3-95.

Tabla 12. Densidad de la inulina

ρ_I , g / ml
aprox. 0,490 \pm 40*

*Dato obtenido de la hoja técnica de la INULINA BERNEO HP (Ver Anexo A)

6. CÁLCULOS Y RESULTADOS

6.1. Cálculo del promedio de humedad del ajo

$$\overline{msa} = \frac{msa_1 + msa_2 + msa_3 + msa_4 + msa_5}{3} \quad (13)$$

$$\%H = \frac{A - \overline{msa}}{A} \quad (14)$$

donde:

msa_i : Masa seca de ajo, [g]

$\%H$: Humedad del ajo

\overline{msa} : Masa promedio seca de ajo, [g]

A : Cantidad de ajo, [g]

Cálculo modelo:

$$\overline{msa} = 29.0296 \text{ g}$$

$$A = 100 \text{ g}$$

$$\%H = 70.9104$$

6.2. Cálculo de la variable relación agua/ajo.

$$Rel_i = \frac{a_i}{A_i} \quad (15)$$

donde:

i : Número de experimentaciones $i = N = 1, 2 \text{ y } 3$

a_i : Volumen de agua, [ml]

A : Cantidad de ajo utilizado para la extracción, [g]

Rel_i : Relación agua/ajo, [ml a/ g A]

Cálculo modelo:

$$i = 1$$

$$a_1 = 800,0000 \text{ ml}$$

$$A_1 = 200,0000 \text{ g}$$

$$Rel_1 = 4,0000 \frac{\text{ml a}}{\text{g A}}$$

Tabla 13. Resultados de la variable relación agua/ajo

A, g		a, ml		Rel, ml a/g A	
e	r	e	r	e	r
200,00		800,00		4,00	
		600,00		3,00	
		400,00		2,00	

6.3. Cálculo de la cantidad de agua retenida en el refinado

$$a_{Ri} = R_i - mts_i \quad (16)$$

donde:

a_{Ri} : Agua retenida en el refinado, [g]

R_i : Refinado,[g]

mts_i : Masa de torta seca, [g]

Cálculo modelo:

$$R = 209,3000 \text{ g}$$

$$mts = 32,4000 \text{ g}$$

$$a_R = 176,9000 \text{ g}$$

Tabla 14. Cantidad de agua retenida en el refinado a T= 30°C

Rel, ml a/g A		R, g		mts, g		a _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		209,300	207,600	32,400	31,900	176,900	175,700
3,000		207,100	204,200	35,400	35,200	171,700	169,000
2,000		195,200	194,500	37,500	38,100	157,700	156,400

Tabla 15. Cantidad de agua retenida en el refinado a T= 55 °C

Rel, ml a/g A		R, g		mts, g		a _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		166,600	169,300	18,400	19,300	148,200	150,000
3,000		178,000	172,400	22,000	21,400	156,000	151,000
2,000		182,800	180,500	27,400	26,800	155,400	153,700

Tabla 16. Cantidad de agua retenida en el refinado a T= 80 °C

Rel, ml a/g A		R, g		mts, g		a _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		157,200	154,600	16,900	17,100	140,300	137,500
3,000		161,200	164,600	21,300	20,900	139,900	143,700
2,000		169,700	174,200	25,600	24,900	144,100	149,300

6.4. Cálculo del volumen de agua retenido en el refinado.

$$Va_{Ri} = \frac{a_{Ri}}{\rho_i} \quad (17)$$

donde:

Va_{Ri} : Volumen de agua retenida en el Refinado, [ml]

a_{Ri} : Agua retenida en el refinado, [g]

ρ_i : Densidad del agua, [g/ml]

Cálculo modelo

$$a_R = 176,9000 \text{ g}$$

$$\rho = 0.9980 \text{ g/ml}$$

$$Va_R = 177.2559 \text{ ml}$$

Tabla 17. Cantidad de agua retenida en el refinado a T= 30 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _R , g		V _{aR} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		21,000	20,000	0,998	0,998	176,900	175,700	177,256	176,016
3,000		19,000	21,000	0,998	0,998	171,700	169,000	171,974	169,340
2,000		23,000	19,000	0,998	0,998	157,700	156,400	158,089	156,650

Tabla 18. Volumen de agua retenido en el refinado a T= 55 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _R , g		V _{aR} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		20,000	20,000	0,998	0,998	148,200	150,000	148,467	150,270
3,000		20,000	19,000	0,998	0,998	156,000	151,000	156,281	151,241
2,000		24,000	22,000	0,997	0,998	155,400	153,700	155,821	154,044

Tabla 19. Volumen de agua retenido en el refinado a T= 80 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _R , g		V _{aR} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		19,000	20,000	0,998	0,998	140,300	137,500	140,524	137,747
3,000		21,000	19,000	0,998	0,998	139,900	143,700	140,181	143,930
2,000		22,000	21,000	0,998	0,998	144,100	149,300	144,422	149,569

6.5. Cálculo de la cantidad de agua retenida en la purificación primaria

$$a_{Rpi} = mthp_i - mtsp_i \quad (18)$$

donde:

a_{Rpi} : Agua retenida en la purificación primaria, [g]

$mthp_i$: Masa torta húmeda en la purificación primaria, [g]

$mtsp_i$: Masa de torta seca en la purificación primaria, [g]

Cálculo modelo:

$$mthp = 13,7427 \text{ g}$$

$$mtsp = 1.0312 \text{ g}$$

$$a_{Rp} = 12.7115 \text{ g}$$

Tabla 20. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T= 30 °C

Rel, ml a/g A		mthp, g		mtsp, g		a _{Rp} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		13,743	13,124	1,031	1,015	12,712	12,109
3,000		9,267	8,997	1,448	1,478	7,819	7,519
2,000		8,314	7,984	1,373	1,346	6,941	6,638

Tabla 21. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T= 55 °C

Rel, ml a/g A		mthp, g		mtsp, g		a _{Rp} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		21,637	20,958	1,652	1,588	19,985	19,371
3,000		19,353	19,488	2,104	1,987	17,249	17,500
2,000		12,574	13,025	2,194	2,201	10,381	10,824

Tabla 22. Cantidad de agua retenida en la purificación primaria a T= 80 °C

Rel, ml a/g A		mthp, g		mtsp, g		a _{Rp} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		22,593	21,488	1,908	1,925	20,685	19,563
3,000		20,799	19,848	2,652	2,549	18,147	17,299
2,000		17,432	16,978	2,741	2,745	14,691	14,233

6.6. Cálculo del volumen de agua retenido en la purificación primaria.

$$Va_{Rpi} = \frac{a_{Rpi}}{\rho_i} \quad (19)$$

donde:

Va_{Rpi} : Volumen de agua retenido luego en la purificación primaria, [ml]

a_{Rpi} : Agua retenida en la purificación primaria, [g]

ρ_{ai} : Densidad del agua, [g/ml]

Cálculo modelo:

$$a_{Rp} = 12,7115 \text{ g}$$

$$\rho_a = 0.9980 \text{ g/ml}$$

$$Va_{Rp} = 12,7371 \text{ ml}$$

Tabla 23. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T= 30 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _{Rp} , g		Va _{Rp} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		21,000	20,000	0,998	0,998	12,712	12,109	12,737	12,130
3,000		19,000	21,000	0,998	0,998	7,819	7,519	7,831	7,534
2,000		23,000	19,000	0,998	0,998	6,941	6,638	6,958	6,649

Tabla 24. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T= 55 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _{Rp} , g		Va _{Rp} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		20,000	20,000	0,998	0,998	19,985	19,371	20,021	19,405
3,000		20,000	19,000	0,998	0,998	17,249	17,500	17,280	17,528
2,000		24,000	22,000	0,997	0,998	10,381	10,824	10,409	10,848

Tabla 25. Volumen de agua retenida en la purificación primaria a T= 80 °C

Rel, ml a/g A		T _{amb} , °C		ρ, g/ml		a _{Rp} , g		Va _{Rp} , ml	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		19,000	20,000	0,998	0,998	20,685	19,563	20,718	19,598
3,000		21,000	19,000	0,998	0,998	18,147	17,299	18,184	17,326
2,000		22,000	21,000	0,998	0,998	14,691	14,233	14,724	14,259

6.7. Cálculo de la concentración promedio de inulina medida en el HPLC

$$\overline{HPLC}_1 = \frac{HPLC_{1i} + HPLC_{2i} + HPLC_{3i}}{3} \quad (20)$$

donde:

\overline{HPLC}_1 : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I/ml Ep]

$HPLC_{1i}$: Concentración de la primera medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

$HPLC_{2i}$: Concentración de la segunda medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

$HPLC_{3i}$: Concentración de la tercera medida de inulina en el HPLC, [mg I/ml Ep]

Cálculo modelo:

$HPLC_{1\ 1} = 18,9040$ mg I/ml Ep

$HPLC_{2\ 1} = 18,9100$ mg I/ml Ep

$HPLC_{3\ 1} = 18,8380$ mg I/ml Ep

$\overline{HPLC}_1 = 18,8840$ mg I/ml Ep

Tabla 26. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T= 30°C

Rel, ml a/g A		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		18,904	19,124	18,910	19,025	18,838	19,125	18,884	19,091
3,000		21,530	21,987	21,433	22,012	21,445	22,047	21,469	22,015
2,000		24,131	23,847	24,205	23,847	23,867	23,687	24,068	23,794

Tabla 27. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T= 55°C

Rel, ml a/g A		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		27,797	26,900	27,799	26,900	27,622	26,900	27,739	26,900
3,000		30,912	29,984	30,945	29,978	31,000	29,897	30,952	29,953
2,000		35,715	36,124	35,382	36,145	35,068	36,187	35,388	36,152

Tabla 28. Concentración promedio de inulina en el HPLC a T= 80°C

Rel, ml a/g A		HPLC ₁ , mg I/ml Ep		HPLC ₂ , mg I/ml Ep		HPLC ₃ , mg I/ml Ep		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		31,219	30,987	31,224	30,968	31,206	31,054	31,216	31,003
3,000		34,154	33,879	34,050	33,878	34,062	33,975	34,089	33,911
2,000		35,946	36,145	35,946	36,158	35,946	36,102	35,946	36,135

6.8. Cálculo de la cantidad de inulina en el extracto purificado

$$I_{Ei} = \frac{E_{pi} * \overline{HPLC}_i}{1000} \quad (21)$$

donde:

I_{Ei} : Cantidad de inulina en el extracto, [g]

E_{pi} : Extracto purificado, [ml]

\overline{HPLC}_i : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I /ml Ep]

Cálculo modelo:

$$E_p = 1100,0000 \text{ g}$$

$$\overline{HPLC}_i = 18,8840 \text{ mg I /ml Ep}$$

$$I_E = 20,7724 \text{ g}$$

Tabla 29. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T= 30°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep		I _E , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		1100,000	1120,000	18,884	19,091	20,772	21,382
3,000		910,000	900,000	21,469	22,015	19,537	19,814
2,000		600,000	648,000	24,068	23,794	14,441	15,418

Tabla 30. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T= 55°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep		I _E , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		1090,000	1105,800	27,739	26,900	30,236	29,746
3,000		890,000	895,000	30,952	29,953	27,548	26,808
2,000		618,400	606,500	35,388	36,152	21,884	21,926

Tabla 31. Cantidad de inulina en el extracto purificado a T = 80°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_i , mg I/ml Ep		I _E , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		980,000	990,000	31,216	31,003	30,592	30,693
3,000		878,000	880,000	34,089	33,911	29,930	29,841
2,000		635,700	638,000	35,946	36,135	22,851	23,054

6.9. Cálculo de la concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua

$$I_{Ei} = E_{pi} * \overline{HPLC}_i \quad (22)$$

$$V_{I_{Ei}} = I_{Ei} / (\rho_I * 1000) \quad (23)$$

$$Va_{E_{pi}} = E_{pi} - V_{I_{Ei}} \quad (24)$$

$$\overline{HPLC} = \frac{I_{Ei}}{Va_{E_{pi}}} \quad (25)$$

donde:

I_{Ei} : Cantidad de inulina en el extracto, [mg]

E_{pi} : Extracto purificado, [ml]

\overline{HPLC}_i : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I/ml Ep]

ρ_I : Densidad de inulina, [g/ml]

$V_{I_{Ei}}$: Volumen de inulina en el extracto purificado, [ml]

$Va_{E_{pi}}$: Volumen de agua en el extracto purificado, [ml]

\overline{HPLC} : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I/mg a]

Cálculo modelo:

$$E_{pi} = 1100,000 \text{ ml}$$

$$\overline{HPLC}_i = 18,884 \frac{\text{mg I}}{\text{mg Ep}}$$

$$I_{Ei} = 20772,400 \text{ mg}$$

$$V_{I_{Ei}} = 42,393 \text{ ml}$$

$$Va_{E_{pi}} = 1057,607 \text{ ml}$$

$$\overline{HPLC} = 19,641 \frac{\text{mg I}}{\text{mg a}}$$

Tabla 32. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T= 30°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep		ρ_I , g/ml		I _E , mg		V _{I_E} , ml		Va _{Ep} , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a _{Ep}	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		1100,000	1120,000	18,884	19,091	0,490		20772,400	21382,293	42,393	43,637	1057,607	1076,363	19,641	19,865
3,000		910,000	900,000	21,469	22,015			19537,093	19813,800	39,872	40,436	870,128	859,564	22,453	23,051
2,000		600,000	648,000	24,068	23,794			14440,600	15418,296	29,471	31,466	570,529	616,534	25,311	25,008

Tabla 33. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T= 55°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep		ρ_I , g/ml		I _E , mg		V _{I_E} , ml		Va _{Ep} , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a _{Ep}	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		1090,000	1105,800	27,739	26,900	0,490		30235,873	29746,020	61,706	60,706	1028,294	1045,094	29,404	28,463
3,000		890,000	895,000	30,952	29,953			27547,577	26807,935	56,220	54,710	833,780	840,290	33,039	31,903
2,000		618,400	606,500	35,388	36,152			21884,145	21926,188	44,662	44,747	573,738	561,753	38,143	39,032

Tabla 34. Concentración promedio de inulina medida en el HPLC en mg Inulina/mg agua a T= 80°C

Rel, ml a/g A		Ep, ml		\overline{HPLC}_1 , mg I/ml Ep		ρ_I , g/ml		I _E , mg		V _{I_E} , ml		Va _{Ep} , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a _{Ep}	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		980,000	990,000	31,216	31,003	0,490		30592,007	30692,970	62,433	62,639	917,567	927,361	33,340	33,097
3,000		878,000	880,000	34,089	33,911			29929,849	29841,387	61,081	60,901	816,919	819,099	36,637	36,432
2,000		635,700	638,000	35,946	36,135			22850,872	23054,130	46,634	47,049	589,066	590,951	38,792	39,012

6.10. Cálculo de la cantidad de inulina en el refinado

Para éste cálculo se considera que la composición del extracto es igual a la composición del retenido.

$$I_{Ri} = \frac{Va_{Ri} * \overline{HPLC}}{1000} \quad (26)$$

donde:

I_{Ri} : Cantidad de inulina en el refinado, [g]

Va_{Ri} : Volumen de agua contenido en el refinado, [ml]

\overline{HPLC} : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I/ml a]

Cálculo modelo:

$$Va_R = 177,256 \text{ ml}$$

$$\overline{HPLC} = 19,641 \frac{\text{mg I}}{\text{ml a}}$$

$$I_R = 3.481 \text{ g}$$

Tabla 35. Cantidad de inulina en el refinado a T= 30°C

Rel, ml a/g A		Va _R , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a_{Ep}		I _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		177,256	176,016	19,641	19,865	3,481	3,497
3,000		171,974	169,340	22,453	23,051	3,861	3,903
2,000		158,089	156,650	25,311	25,008	4,001	3,918

Tabla 36. Cantidad de inulina en el refinado a T= 55°C

Rel, ml a/g A		Va _R , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a_{Ep}		I _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		148,467	150,270	29,404	28,463	4,366	4,277
3,000		156,281	151,241	33,039	31,903	5,163	4,825
2,000		155,821	154,044	38,143	39,032	5,944	6,013

Tabla 37. Cantidad de inulina en el refinado a T= 80°C

Rel, ml a/g A		Va _R , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a_{Ep}		I _R , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		140,524	137,747	33,340	33,097	4,685	4,559
3,000		140,181	143,930	36,637	36,432	5,136	5,244
2,000		144,422	149,569	38,792	39,012	5,602	5,835

6.11. Cálculo de la cantidad de inulina retenida en la purificación primaria

$$I_{Rpi} = \frac{Va_{Rpi} * \overline{HPLC}}{1000} \quad (26)$$

donde:

I_{Rpi} : Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria, [g]

Va_{Rpi} : Volumen de agua retenido en la purificación primaria, [ml]

\overline{HPLC}_{promi} : Concentración promedio de inulina medida en el HPLC, [mg I/ml a]

Cálculo modelo:

$$Va_{Rp} = 12,737 \text{ ml}$$

$$\overline{HPLC} = 19,641 \frac{\text{mg I}}{\text{ml a}}$$

$$I_{Rp} = 0,250 \text{ g}$$

Tabla 38. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T =30°C

Rel, ml a/g A		Va _{RP} , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a_{Ep}		I _{RP} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		12,737	12,130	19,641	19,865	0,250	0,241
3,000		7,831	7,534	22,453	23,051	0,176	0,174
2,000		6,958	6,649	25,311	25,008	0,176	0,166

Tabla 39. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T = 55°C

Rel, ml a/g A		Va _{RP} , ml		\overline{HPLC} , mg I/ml a_{Ep}		I _{RP} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		20,021	19,405	29,404	28,463	0,589	0,552
3,000		17,280	17,528	33,039	31,903	0,571	0,559
2,000		10,409	10,848	38,143	39,032	0,397	0,423

Tabla 40. Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria a T = 80°C

Rel, ml a/g A		Va _{Rp} , ml		$\overline{\text{HPLC}}$, mg I/ml α_{Ep}		I _{Rp} , g	
e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		20,718	19,598	33,340	33,097	0,691	0,649
3,000		18,184	17,326	36,637	36,432	0,666	0,631
2,000		14,724	14,259	38,792	39,012	0,571	0,556

6.12. Cálculo de la cantidad y porcentaje de inulina en el ajo

$$I_i = I_{Ei} + I_{Ri} + I_{Rpi} \quad (27)$$

donde:

I_i : Cantidad de inulina en el ajo, [g]

I_{Ei} : Cantidad de inulina en el extracto, [g]

I_{Ri} : Cantidad de inulina en el refinado, [g]

I_{Rpi} : Cantidad de inulina retenida en la purificación primaria, [g]

$$\% I_i = \frac{I_i}{A} \quad (28)$$

donde:

$\% I_i$: Porcentaje de inulina en el ajo

A : Cantidad de ajo utilizado para la extracción, [g]

Cálculo modelo:

$$I_E = 20,772 \text{ g}$$

$$I_R = 3,481 \text{ g}$$

$$I_{Rp} = 0,250 \text{ g}$$

$$I = 24,504 \text{ g}$$

$$A = 200,000 \text{ g}$$

$$\% I = 12.252$$

Tabla 41. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 30°C

Rel, ml a/g A		I _E , g		I _R , g		I _{RP} , g		I, g		% I	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		20,772	21,382	3,481	3,497	0,250	0,241	24,504	25,120	12,252	12,560
3,000		19,537	19,814	3,861	3,903	0,176	0,174	23,574	23,891	11,787	11,945
2,000		14,441	15,418	4,001	3,918	0,176	0,166	18,618	19,502	9,309	9,751

Tabla 42. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 55°C

Rel, ml a/g A		I _E , g		I _R , g		I _{RP} , g		I, g		% I	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		30,236	29,746	4,366	4,277	0,589	0,552	35,190	34,575	17,595	17,288
3,000		27,548	26,808	5,163	4,825	0,571	0,559	33,282	32,192	16,641	16,096
2,000		21,884	21,926	5,944	6,013	0,397	0,423	28,225	28,362	14,112	14,181

Tabla 43. Cantidad y porcentaje de inulina en el ajo a T = 80°C

Rel, ml a/g A		I _E , g		I _R , g		I _{RP} , g		I, g		% I	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		30,592	30,693	4,685	4,559	0,691	0,649	35,968	35,901	17,984	17,950
3,000		29,930	29,841	5,136	5,244	0,666	0,631	35,732	35,716	17,866	17,858
2,000		22,851	23,054	5,602	5,835	0,571	0,556	29,024	29,445	14,512	14,723

6.13. Cálculo de las coordenadas para el trazado de la curva de refinado en el diagrama triangular de extracción sólido-líquido.

$$x_i = \frac{I_{Ri}}{R_i} \quad (29)$$

donde:

x_i : Valores de la abscisa, $\left[\frac{gI_{Ri}}{gR} \right]$

I_{Ri} : Cantidad de inulina en el refinado, [g]

R_i : Refinado, [g]

$$y_i = \frac{a_{Ri}}{R} \quad (30)$$

donde:

y_i : Valores de la ordenada, $\left[\frac{ga_{Ri}}{gR} \right]$

a_{Ri} : Agua retenida en el refinado, [g]

R_i : Refinado, [g]

Cálculo modelo

$$R_i = 209,300 \text{ g}$$

$$a_{Ri} = 176,900 \text{ g}$$

$$I_{Ri} = 3.481 \text{ g}$$

$$x_i = 0.017 \left[\frac{gI_{Ri}}{gR} \right]$$

$$y_i = 0.845 \left[\frac{ga_{Ri}}{gR} \right]$$

Tabla 44. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T= 30°C

Rel, ml a/g A		R, g		a _R , g		I _R , g		x, g I _R / g R		y, g a _R / g R	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		209,300	207,600	176,900	175,700	3,481	3,497	0,017	0,017	0,845	0,846
3,000		207,100	204,200	171,700	169,000	3,861	3,903	0,019	0,019	0,829	0,828
2,000		195,200	194,500	157,700	156,400	4,001	3,918	0,020	0,020	0,808	0,804

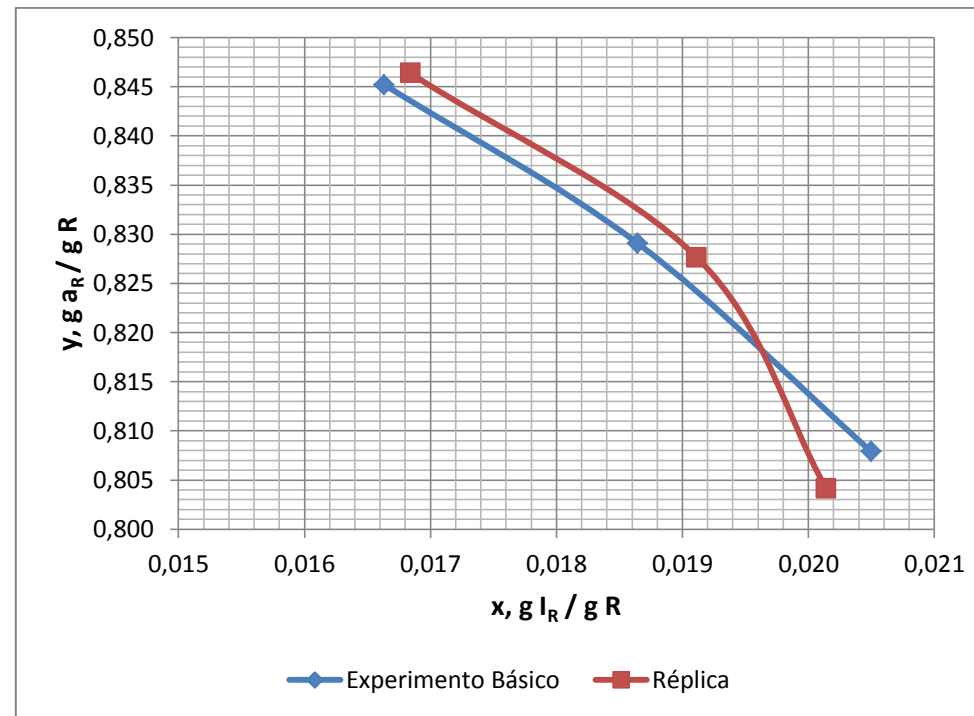


Gráfico 1. Curva de refinado a T= 30°C

Tabla 45. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T= 55°C

Rel, ml a/g A		R, g		a _R , g		I _R , g		x, g I _R / g R		y, g a _R / g R	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		166,600	169,300	148,200	150,000	4,366	4,277	0,026	0,025	0,890	0,886
3,000		178,000	172,400	156,000	151,000	5,163	4,825	0,029	0,028	0,876	0,876
2,000		182,800	180,500	155,400	153,700	5,944	6,013	0,033	0,033	0,850	0,852

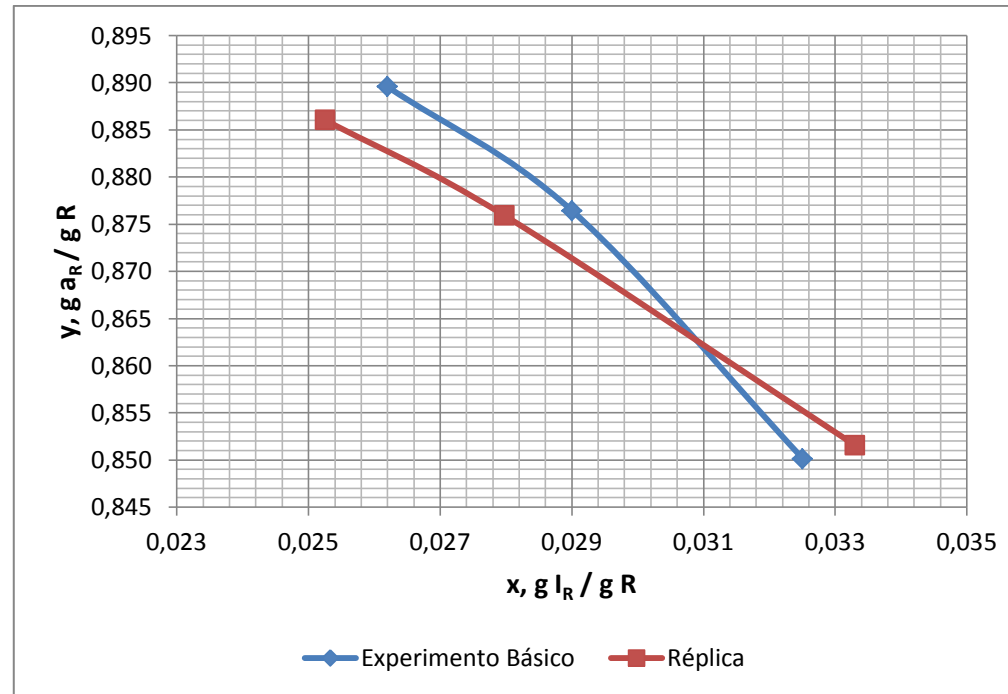


Gráfico 2. Curva del refinado a T= 55°C

Tabla 46. Valores de las coordenadas de la curva de refinado a T= 80°C

Rel, ml a/g A		R, g		a _R , g		I _R , g		x, g I _R / g R		y, g a _R / g R	
e	r	e	r	e	r	e	r	e	r	e	r
4,000		157,200	154,600	140,300	137,500	4,685	4,559	0,030	0,029	0,892	0,889
3,000		161,200	164,600	139,900	143,700	5,136	5,244	0,032	0,032	0,868	0,873
2,000		169,700	174,200	144,100	149,300	5,602	5,835	0,033	0,033	0,849	0,857

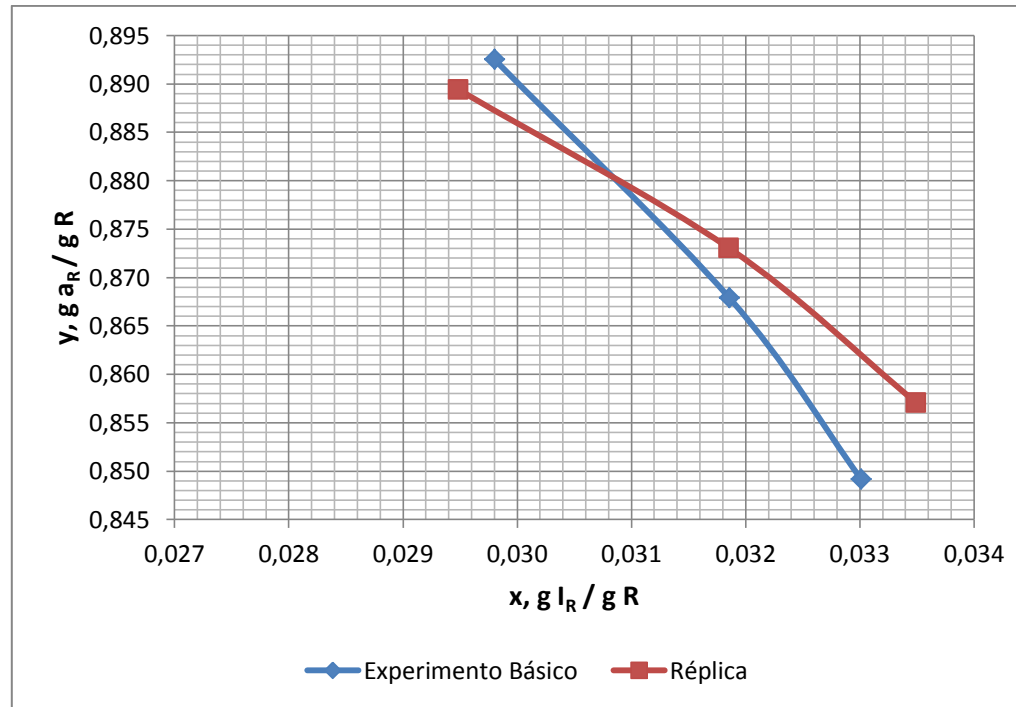


Gráfico 3. Curva del refinado a T= 80°C

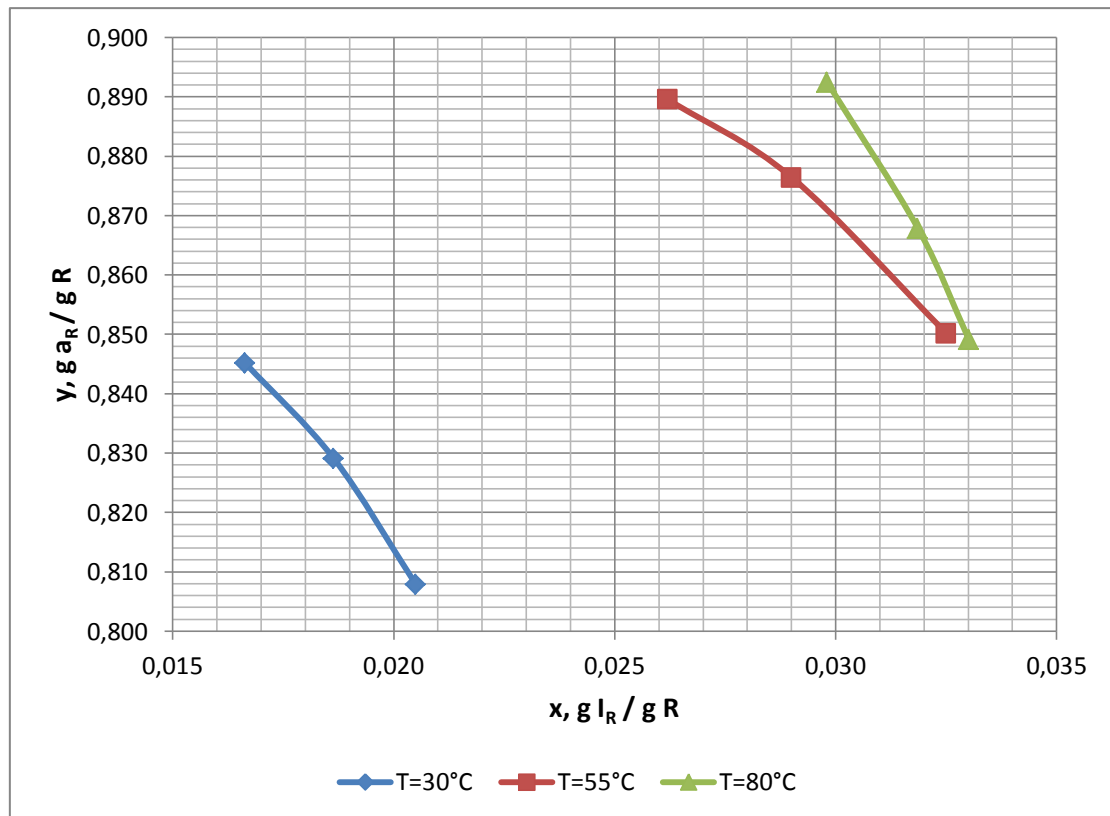


Gráfico 4. Curvas del refinado de los experimentos básicos

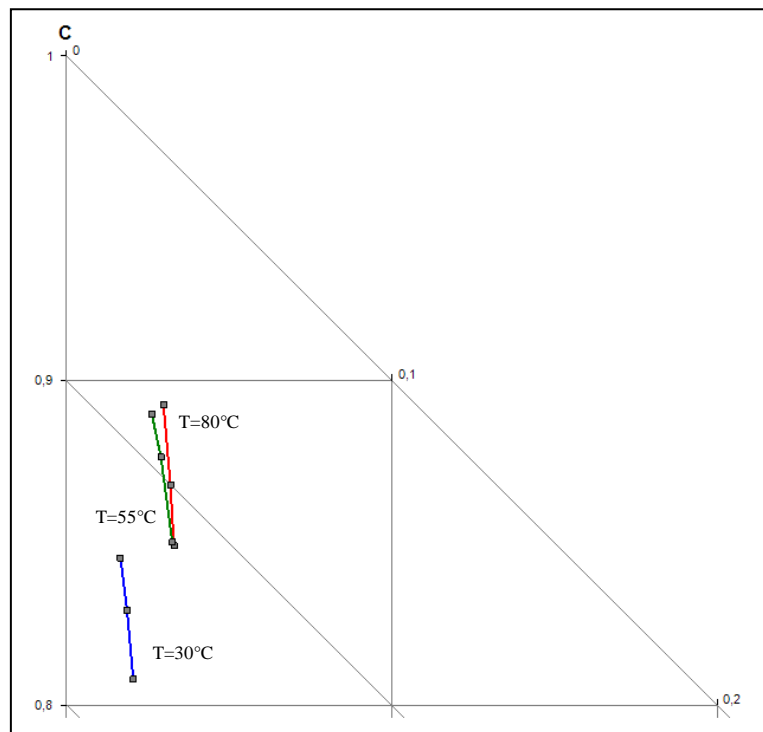


Figura 14. Representación en el diagrama triangular de las curvas de refinado de las experimentaciones básicas.

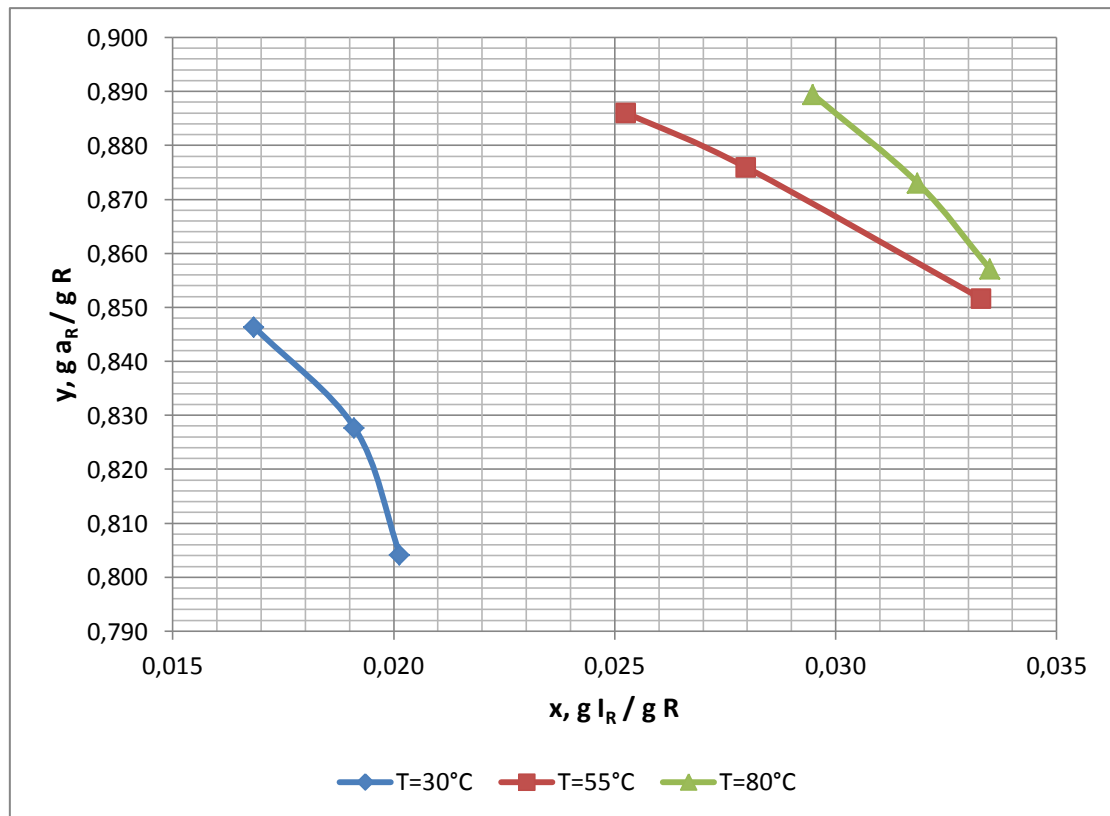


Gráfico 5. Curvas del refinado de las réplicas.

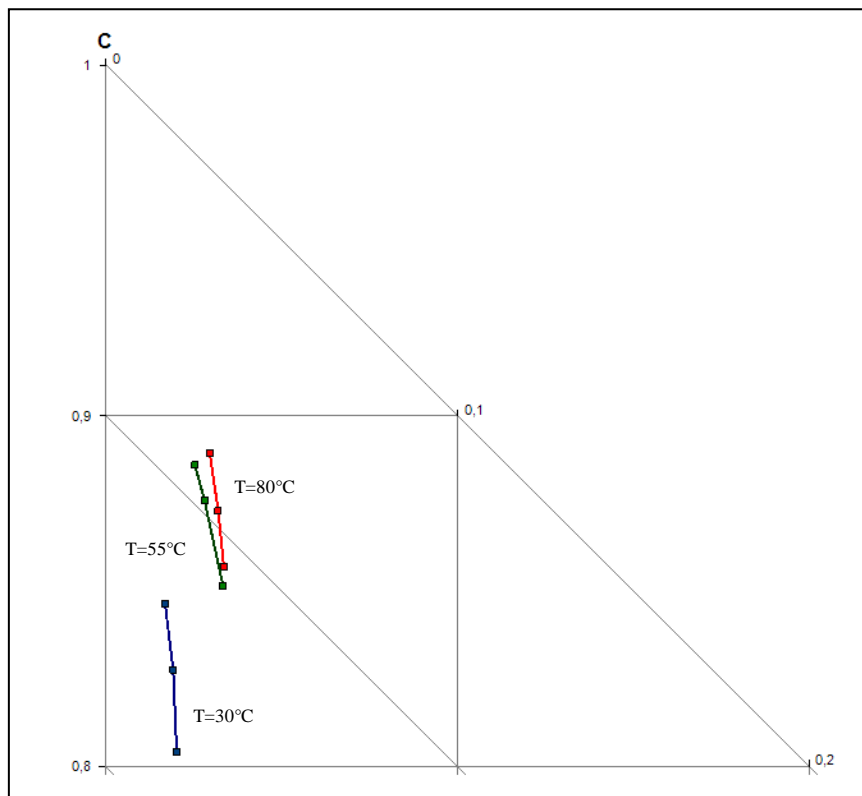


Figura 15. Representación en el diagrama triangular de las curvas de refinado de las réplicas

7. DISCUSIÓN

- La operación de extracción sólido líquido en contacto directo resulta útil para determinar la cantidad de inulina en el ajo. Los factores que influyen en la extracción se analizan y a través de pruebas de laboratorio es posible determinar los parámetros y las variables que influyen en la extracción. Así, para extraer inulina se combinan las variables relación agua/ajo y temperatura, obteniendo datos y resultados positivos. El volumen de extracto obtenido va disminuyendo con el aumento de la temperatura, evidentemente porque existe una mayor evaporación del agua en la extracción. El análisis y cuantificación de inulina en mg inulina/ml solución, contenida en el extracto disminuye conforme aumenta la relación de agua/ajo en la extracción, debido a que la cantidad de agua va aumentando y la solución se vuelve más diluida, es decir, la concentración de inulina disminuye.
- Las cantidades de inulina obtenidas en los extractos purificados en las combinaciones de variables: $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, ambas a $Rel = 4$, dan valores cercanos aproximadamente de 30,0 g y 30,6 g de inulina respectivamente, lo que significa que se ha extraído completamente la inulina del ajo a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y que a $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ hay una buena extracción, sin embargo se puede considerar que si se desea realizar una extracción se podría trabajar disminuyendo la temperatura, menor que $80\text{ }^{\circ}\text{C}$, con la misma relación de agua/ajo.
- Los porcentajes de inulina obtenidos en las combinaciones de variables $Rel = 3$ y $Rel = 4$, ambas a $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ son alrededor de 17,8% y 17,9% respectivamente, por lo tanto en éste caso la cantidad de agua que se vaya a utilizar no va a influir en la determinación del porcentaje de inulina presente en el ajo.
- La cuantificación de inulina realizada en el HPLC está en función de la preparación del equipo, de la fase móvil y de las soluciones estándar, alguna falla producida ya sea por el analista o por el equipo en este caso que no se lo haya acondicionado bien, que el detector no se encuentre limpio o que las fase móvil y estándares no se hayan preparado con precaución, provocaría que se obtengan datos que afectarán definitivamente en los resultados. Una variación errónea del dato de la medición realizada provoca resultados falsos, algunas veces no son visibles y aparentemente son los correctos ya que sigue la tendencia de los demás datos, pero al realizar los cálculos se observa que hay fallas en la medición.

Las curvas del refinado también son útiles para verificar la correcta medición, el comportamiento de éstas permite demostrar si la extracción y la cuantificación están correctamente realizadas.

- Las curvas del refinado representan diferentes proporciones de las mezclas ternarias: inulina, agua e inerte, cada curva es elaborada para cada temperatura de trabajo. La cantidad retenida está en función de la composición de inulina en el extracto, dado que no es posible determinar de forma directa se asume que la composición del retenido es igual a la del extracto. Los resultados de las composiciones de inulina y agua en el refinado son pequeñas y cercanas, en el caso de las curvas a $T = 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $T = 80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Gráficos 14 y 15) se observa una capacidad de retención similar y mayor que a $T = 30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8. CONCLUSIONES

- Extraer fructanos tipo inulina del ajo blanco común si es factible mediante el método de extracción sólido-líquido en contacto directo, utilizando como solvente agua caliente y trabajando con las variables de proceso: relación agua/ajo y temperatura.
- El porcentaje de inulina encontrado en el ajo blanco común es aproximadamente del 18%, por lo que la cantidad de inulina depende de la naturaleza del ajo, dado que teóricamente reporta un valor entre 15% y 20%.
- La cantidad de agua que se utilice para la cuantificación de inulina no influye en la determinación del porcentaje, a una temperatura de 80 °C y a una relación agua/ajo de al menos 3, se puede cuantificar la cantidad de inulina presente en el ajo.
- La concentración de inulina disminuye con el aumento de la relación agua/ajo, esto es evidente debido a que al incrementar la cantidad de agua, la solución se vuelve más diluida y la concentración de inulina en el extracto disminuye.
- La concentración de inulina se incrementa con el aumento de temperatura, la inulina resulta ser más soluble en agua caliente, y la extracción es más eficiente a temperaturas mayores de 55 °C.
- El proceso de extracción de inulina del ajo establecido consiste en tres etapas: la preparación de la materia prima, poner en contacto el agua y el ajo en las mejores condiciones de $Rel= 4$ y $T= 80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en el que se obtiene alrededor de 30,7 g de inulina a partir de 200 g de ajo y la obtención del extracto que finalmente es purificado mediante carbonatación e intercambio de cationes y aniones.
- Las curvas de refinado (Gráficos 14 y 15) realizadas experimentalmente para cada temperatura y concentración, revela que a temperaturas mayores que 55 °C hay mayor capacidad de retención de la solución de inulina en el refinado, este comportamiento es cercano hasta los 80 °C. El refinado tiene mayor concentración de inulina y de agua, evaluada de acuerdo a la concentración de inulina medida en el extracto purificado.

9. RECOMENDACIONES

- Las condiciones climáticas, de cultivo y de almacenamiento posiblemente influyan en la concentración de inulina presente en el ajo, por lo que es conveniente repetir este estudio para verificar la cantidad de inulina que contiene el ajo blanco común.
- Debido a la cantidad de inulina que se logra extraer del ajo, se recomienda concentrar el extracto aumentando la temperatura y posteriormente obtener inulina cruda o nativa mediante un adecuado procedimiento de cristalización.
- Dado que el tipo de ajo también influye en el contenido de inulina es conveniente realizar el estudio de extracción y cuantificación de inulina con otras variedades, puede realizarse el estudio del ajo producido en nuestra tierra, el ajo ambateño, con un aspecto diferente al ajo blanco, ya que es conformado por solamente de un bulbo, o de los ajos violeta, rojo, morado o negro.
- Mediante una evaluación de diseño industrial y estudio de prefactibilidad se puede evaluar si es posible extraer inulina en polvo del ajo para comercializarla, es necesario realizar este estudio porque a pesar de que el contenido de inulina es alto, en el caso del ajo blanco común, puede no ser factible producirlo industrialmente. En el caso que si sea factible se tendría nuevas oportunidades de trabajo y la producción de inulina en el Ecuador.
- El procedimiento de extracción y cuantificación establecido en este trabajo es aplicable para cualquier fuente de extracción o materia prima, puede considerarse solo la extracción y la purificación o conjuntamente con la cuantificación. Se recomienda evaluar la cantidad de inulina presente en la jícama, que crece en Guayllabamba o en ciertas zonas montañosas del país como en Latacunga, Riobamba, Guaranda, Saraguro y Loja.

CITAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] MONTALBÁN, José. *Ficha de plantas útiles: ajo*. 2013 [Fecha de Consulta: 1 Julio 2013]. Disponible en:
<<http://www1.etsia.upm.es/departamentos/botanica/fichasplantas/ajohab.html>>
- [2] BRAVO DÍAZ, Luis. *Farmacognosia*. Editorial Elsevier, Madrid, 2006. p. 186
- [3] CARDONA PAREJA, Leonardo y GONZÁLEZ PATIÑO, Paula Andrea. *Obtención y caracterización de la oleorresina del ajo (Allium sativum)*. Trabajo de Grado. Tecnólogo Químico. Facultad de Tecnología. Pereira. s.f. p.73
- [4] GARCÍA ALONSO, Carlos R. *El Ajo: Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Mundi-Prensa, España, 1998. p.186
- [5] BRAVO DÍAZ, Luis. *Farmacognosia*. Editorial Elsevier, Madrid, 2006. p. 187
- [6] GARCÍA ALONSO, Carlos R. *El Ajo: Cultivo y Aprovechamiento*. Editorial Mundi-Prensa, España, 1998. p.186
- [7] BRAVO DÍAZ, Luis. *Farmacognosia*. Editorial Elsevier, Madrid, 2006. p. 188
- [8] Traducido al español de: KAUR, Narinder and GUPTA, Anil K. *Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition*. J. Biosci. 27(7): december 2002. p. 709
- [9] Traducido al español de: FRANCK, Anne. y DE LEENHEER, Leen. *Inulin*. In: *Inulin biopolymers online*. Belgium, 2005. p. 440
- [10] ULLOA, J., ESPINOSA, H., CRUZ, G., ULLOA, P., ULLOA, B., RAMIREZ, J. *Los fructanos y su papel en la promoción de la salud*. 2010 [Fecha de consulta: 10 Julio 2013]. Disponible en: <<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/02-05/7.pdf>>.

- [11] ULLOA, J., ESPINOSA, H., CRUZ, G., ULLOA, P., ULLOA, B., RAMIREZ, J., *Los fructanos y su papel en la promoción de la salud*. 2010 [Fecha de consulta: 11 Julio 2013]. Disponible en: <<http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/02-05/7.pdf>>.

- [12] Traducido al español de: MORROS Camps, Jordi. *Obtenció de Tensioactius biopolimèrics basats en la inulina en mediaquòs*. Tesis Doctoral. Ingeniería del Medi Ambient i del Producte. Universitat de Barcelona. Barcelona. 2011. p. 192

- [13] Traducido al español de: CHARALAMPOPOULOS, Dimitri y RASTALL, Robert. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Editorial Springer, United Kingdom, 2009.Vol 1, pp. 168-199

- [14] CHACÓN VILLALOBOS, Alejandro. *Perspectivas agroindustriales actuales de los oligofructosacáridos (FOS)*. Agronomía Mesoamericana. 17(2): 278-279, 2006.

- [15] Traducido al español de: Association of Official Analytical Chemist (AOAC) Official Method 997.08. *Fructans in Food Products. Ion Exchange Chromatographic Method*. 1999 [Fecha de consulta: 20 Julio 2013]. Disponible en: <<http://wenku.baidu.com/view/31b4662cb4daa58da0114a9f.html>>

- [16] Traducido al español de: Association of Official Analytical Chemist (AOAC) Official Method 999.03. *Measurement of Total Fructan in Foods. Enzymatic/Spectrophotometric Method*. 1999 [Fecha de consulta: 20 Julio 2013]. Disponible en: <<http://wenku.baidu.com/view/dace58d176a20029bd642d57.html>>

- [17] Traducido al español de: HARKER, J. H. and RICHARDSON J.F. *Leaching*. In: *Coulson and Richardson's Chemical Engineering*. Fifth Edition. Butterworth Heinemann. Oxford, 2002, pp. 530-531

- [18] OCON GARCÍA, Joaquín y TOJO BARREIRO Gabriel. *Extracción Sólido-Líquido*. En: *Problemas de Ingeniería Química*. Tomo II. Editorial Aguilar. s.l. s.f. pp. 211-212

- [19] Traducido al español de: HARKER, J. H. and RICHARDSON J.F. *Leaching*. In: *Coulson and Richardson's Chemical Engineering*. Fifth Edition. Butterworth Heinemann. Oxford, 2002, pp. 532-533

BIBLIOGRAFÍA

ARANGO BEDOYA, Oscar; CUARÁN, Ginna Paola y FAJARDO, Juan Camilo. *Extracción, Cristalización y Caracterización de inulina a partir de yacón (Smallanthus sonchifolius (Poepp. & Endl.)) para su utilización en la industria alimentaria y farmacéutica*. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 6(2): 14-20, diciembre 2008.

BARCLAY, Thomas et al. *Inulin - A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses*. T.H.E. Journal, 1(3) : 27-50, october 2010.

BHONGOLETHU MAVUMENGWANA, Vuyo. *Isolation, purification and characterization of inulin and fructo-oligosaccharides from chicorium intybus and inulinase from Aspergillus niger*. Degree of Master Science. Rhodes University. Faculty of Science. Grahamstown-South Africa. 2004. p. 112

BOSSCHER, Douwina. *Fructan prebiotics derived from inulin*. In: Charalampopoulos, Dimitris y RASTALL, Robert A. *Prebiotics and Probiotics Science and Technology*. Springer. Ney York, 2009, pp. 163-200

CASTELLANOS PÉREZ, Nahum et al. *Optimización de los procesos de extracción y fraccionamiento por grado de polimerización de fructanos, obtenidos a partir de agave tequilana weber var. Azul, para la obtención de prebióticos*. Gayana Bot. 69 (Número Especial): 31-39, 2012. ECURED. Inulina. [en línea]. 2013 [Fecha de Consulta: 13 Julio 2013]. Disponible en: <<http://www.ecured.cu/index.php/Inulina>>

EUROFINS *Carbohydrates testing. Dietary fibers*. 2013 [Fecha de Consulta: 25 Mayo 2013]. Disponible en: <<http://www.dietaryfibretesting.com/>>

GARCÍA GÓMEZ, L. Jacinto y SÁNCHEZ-MUNIZ, Francisco J. *Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (Allium sativum)*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 50(3), septiembre 2000.

GEANKOPLIS, Christie J. *Procesos de transporte y Operaciones unitarias*. Tercera Edición. Editorial Continental. México, 1998, p. 1008

HPLC *Cromatografía Líquida de Alta Resolución*. Curso de Capacitación. Escuela Técnica ORT. Departamento de Química. Argentina. s.f. p. 21

IBARRA HERNÁNDEZ, Eduardo Benjamín; BOTERO GONZÁLEZ, José Fernando y CORTÉS AMADOR Carlos. *Ingeniería de tequilas*. s.n. Bogotá, 2010, p. 78

Infojardín. Ajo, ajos, ajo blanco (Allium sativum). 2013 [Fecha de Consulta: 1 Julio 2013]. Disponible en: <<http://fichas.infojardin.com/hortalizas-verduras/ajos-ajo-blanco.htm>>

KISS, Atila and FORGO, Peter. *Investigations on inulin-type oligosaccharides with regard to HPLC analysis and prospective food applicability*. Monatsh Chem. 142 : 547-553, april 2011

MADRIGAL, Lorena y SANGRONIS, Elba. *La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales*. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. 57(4): 387-396, noviembre 2007

MATEOS-APARICIO, Inmaculada. *Aprovechamiento de subproductos de leguminosas para la obtención de productos funcionales. Comparación de metodologías para la caracterización de la fibra alimentaria*. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología II. Madrid. 2008. 235 p.

MUJICA PONS, Xavier. *El primer pilar de la salud total: el ajo y los usos medicinales del ajo*. En: *Ajo, cebolla, miel y limón*. Editorial Lea, Argentina, 2012

PHELPS, C. F. *The physical properties of inulin solutions*. Biochem. 95(41): 41-47, 1965.

PROSKY, Leon and HOEBREGS, Hubert. *Methods to determine food inulin and oligofructose*. The Journal of Nutrition. 129(7): 1418-1423, july 1999.

RETNANINGTYAS, Yuni. *Determination of inulin from multivitamin syrup product by high performance with RI detector*. Indo. J. Chem. 12(2): 201-205. Indonesia, february 2012.

ROBERFROID, Marcel B. *Inulin-type fructans: functional food ingredients*. The Journal of Nutrition.137 (11): 2493-2502, November 2007.

SAENGTHONGPINIT, Wanpen, *Influence of harvest time and storage temperature on characteristics of inulin from jerusalem artichoke and physicochemical properties of inulin-starch mixed gel*. Degree of Doctor. Philosophy (Food Science). Kasetsart University. Food Science and Technology Department. Thailand. 2005. 199 p.

SHODEX. *Lección 1: Introducción al HPLC*. 2013 [Fecha de Consulta: 2 de Agosto]. Disponible en: <<http://www.shodex.net/index.php?seitenid=1&applic=1472>>

ŠIMONOVÁ, Ivana et al. *HPLC: determination of inulin in plant materials*. Acta Chimica Slovaca.3(2): 122-129. 2010.

SMITS, George y DE LEENHEER, Leen. *Proceso de fabricación de inulina de achicoria*. España 2 203 063. (C08B 37/18 A01G 1/00), 01 abril 2004. 1049723, 8 noviembre 2000. p. 23

TOFANO C. LEITE, Juliana et al. *Study of inulin concentration by physical methods*. 14th International Drying Symposium.Vol. B: 868-875. Sao Paulo, 22-25, august 2004.


ANEXOS

ANEXO A. Hoja de especificaciones de la inulina BERNEO HP

Hoja de Especificaciones

Orafti®HP

DOC.CHA4-05*06/08



Descripción

Orafti®HP es una inulina de alto rendimiento. Es un ingrediente alimenticio compuesto de inulina de achicoria de la cual se han extraído las moléculas más pequeñas (patente en curso).

Inulina de achicoria es una mezcla de oligo- y polisacáridos compuestos de unidades de fructosa unidas entre sí mediante enlaces β(2-1). Prácticamente cada molécula se termina con una unidad de glucosa. El recuento de unidades de fructosa o glucosa (= grado de polimerización o DP) de la gama de inulinas de achicoria se halla principalmente entre 2 y 60.

Especificaciones de composición

Todos los valores se expresan sobre materia seca.
Métodos analíticos : ver nuestros folletos técnicos.

Inulina	> 99,5 %
Inulina DP ≥5	≥ 99 %
Glucosa + fructosa + sacarosa	≤ 0,5 %
Materia seca (d.m.)	97 ± 1,5 %
Contenido en carbohidratos	> 99,5 %
DP promedio de la inulina	≥ 23
Cenizas (sulfatadas)	< 0,2 %
Conductividad (15°Brix)	< 250 µS
Metales pesados	Pb, As cada uno < 0,1 mg/kg Cd, Hg cada uno < 0,01mg/kg
pH (10°Brix)	5,0 - 7,0

Especificaciones microbiológicas

Todos los valores se expresan sobre materia seca.
Métodos analíticos : ver nuestros folletos técnicos.

Aeróbicos mesófilos – recuento total	max. 1000/g
Levaduras	max. 20/g
Mohos	max. 20/g
Esporas aeróbicas termófilas	max. 1000/g
Anaeróbicos H ₂ S productores de esporas termófilas	max. 25/g
Enterobacteriaceae	ausente en 1 g
Bacillus cereus	max. 100/g
Staphylococcus aureus	ausente en 1 g
Escherichia coli	ausente en 1 g
Clostridium perfringens	ausente en 1 g
Clostridium botulinum	ausente en 1 g
Salmonella	ausente en 100 g
Listeria	ausente en 25 g

HP CHA4-05-06-08 .doc

1/2

BERNEO-Orafti - Aardoebruit 5, B - 3100 Tienen Belgium - Phone +32 16 801 301 - Fax +32 16 801 308 - info@BERNEO-Orafti.com - www.BERNEO-Orafti.com

Figura A1. Hoja de especificaciones de la INULINA BERNEO HP (Hoja 1/2)

ANEXO A. (Continuación)



Etiquetado

Todos los valores son valores promedios expresados por 100 g de producto comercial.

Carbohidratos	0 (97 ¹⁾)	Gluten	ausente
Azúcares	0	Lactosa	ausente
Fibra dietética ²⁾	97	Leche/cama/derivados del huevo	ausente
Proteína	ausente	Semillas/componentes de la soja	ausente
Grasa	ausente	Insecticidas, pesticidas	ausente
Vitaminas y Minerales	insignificante	Nueces, frutos secos	ausente
Valor Calórico ³⁾	97 kcal/407 kJ	Colza	ausente
Proteinheite ⁴⁾	0	Otros alérgenos	ausente
		Actividad enzimática	ausente
		Folste	ausente

1) incluyendo fibra dietética
 2) medido por el método AOAC 997.08
 3) valor calórico basado en 1 kcal/g para inulina pura. Valor susceptible de ser adaptado a las regulaciones locales.
 4) conforme a las regulaciones alemanas.

Otra Información ver también nuestros folletos técnicos

Aspecto	Polvo blanco finamente granulado.
Comportamiento	Hygroscópico.
Sabor	Neutral, no dulce, sin dejar gusto.
Solubilidad en agua	< 5 g/l a 25°C
Mojabilidad en agua	Buena.
Dispersabilidad en agua	Se requiere agitar.
Propiedades y aplicaciones	Ver nuestros folletos técnicos.
Tamaño de partículas	Ver documento "Tamaño de Partículas".
Densidad	Aprox. 480 ± 40 g/l.
Etiquetado – Lista de Ingredientes	Inulina.
Seguridad	Seguro, No tóxico, No peligroso. El consumo excesivo puede ocasionar efectos laxantes. Es, como otros polvos finos, que cuando se mezclan con el aire y se encienden, pueden causar una explosión.
Envasado	Sacos de papel en pallets, ver "Especificaciones de los Envases".
Condiciones óptimas de almacenamiento	Fresco y seco, en su envase hermético original.
Máxima duración	Ver envase (mínimo 18 meses fecha entrega).
Condiciones de transporte	Según documento "Condiciones de Transporte".
Irradiación	No irradiado.
GMO	No contiene OGM ni componentes derivados. No es fabricado utilizando tecnología basada en OGM.
Kosher	Certificado, Orthodox Union (OU).
Halal	Certificado, The Islamic Food and Nutrition Council of America (IFANCA).
Origen vegetal	Adecuado para vegetarianos.
Producido por	ORAFTI – ver dirección en etiqueta de envase.

Representado por:



To the best of our knowledge, this information is reliable but should not be considered as a warranty.
 Verantwortungsmittel bei sachlicher oder rechtlicher Haftung.

HP CHA4-05-08-08 .doc 2/2

BENEÓ-Drafti - Aardenbosstraat 1, 5 - 3300 Tienen Belgium - Phone +32 16 821 321 - Fax +32 16 821 328 - info@BENEÓ-Drafti.com - www.BENEÓ-Drafti.com

Figura A2. Hoja de especificaciones de la INULINA BERNEO HP (Hoja 2/2)

ANEXO B. Reporte fotográfico de la extracción inulina y purificación de la solución de inulina



Figura B1. Extracto de inulina del ajo



Figura B2. Carbonatación del extracto de ajo

ANEXO B. (Continuación)



Figura B3. Extracto purificado mediante intercambio de iones, al inicio una solución generalmente amarilla que luego de la purificación se torna clara.



Figura B4. Refinado húmedo y seco

ANEXO C. Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución para cuantificar inulina



Figura C1. Cromatógrafo líquido de alta resolución Alliance 2659 con Detector Índice de Refracción 2414.

ANEXO D. Recta de calibración del HPLC y reporte de inulina para las condiciones recomendadas de cuantificación

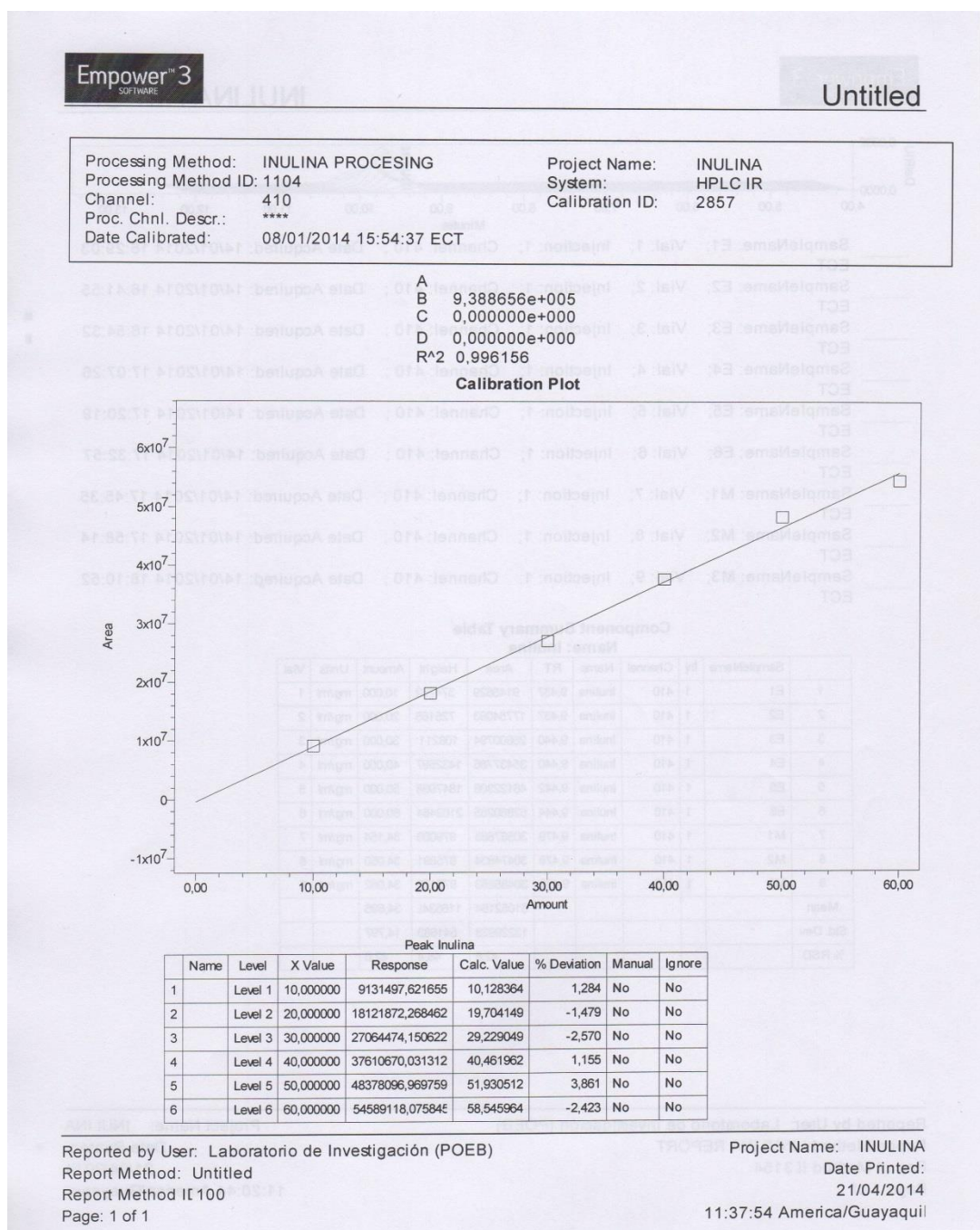


Figura D1. Curva de calibración

ANEXO D. (Continuación)

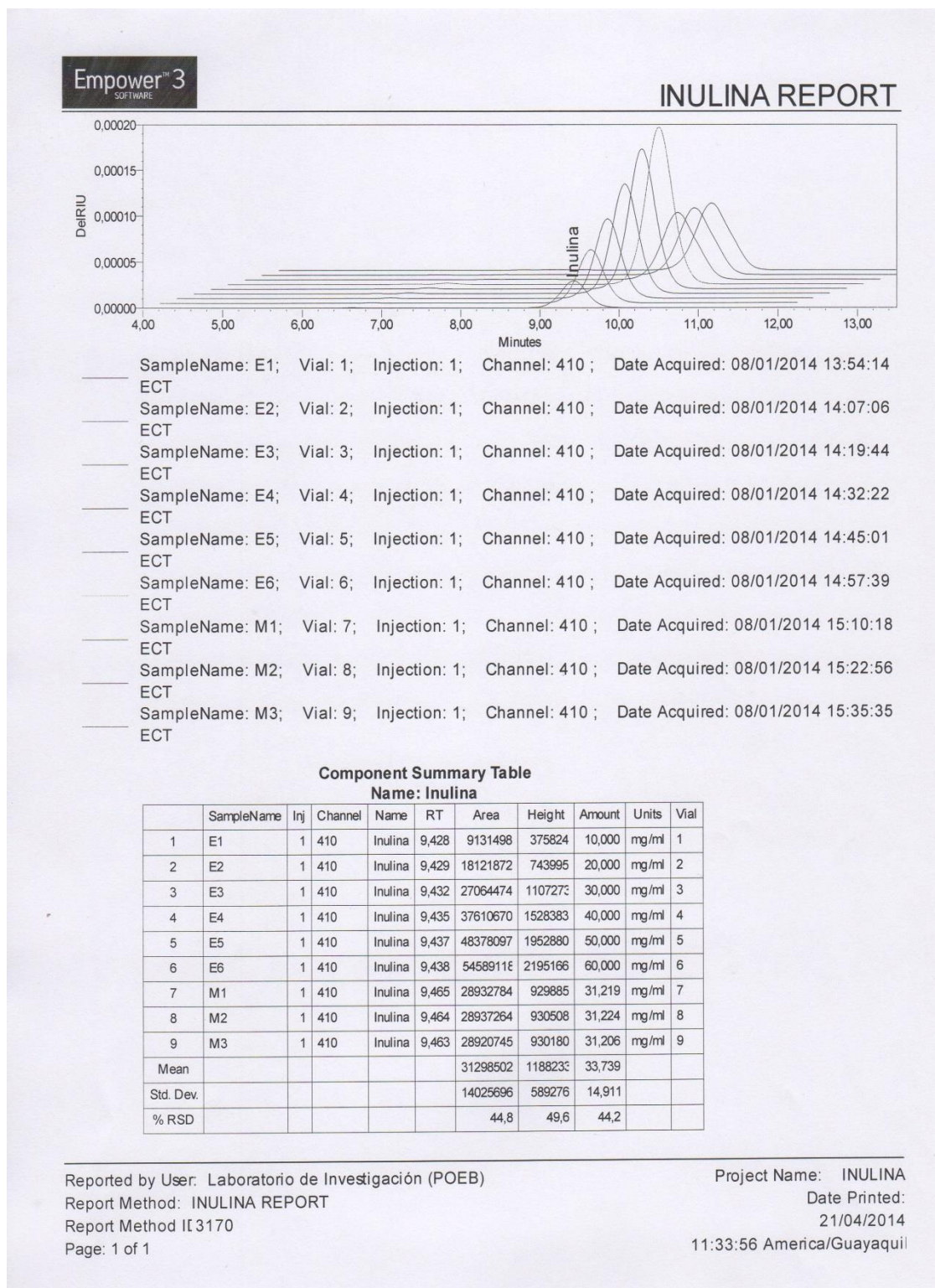


Figura D2. Reporte de resultados de inulina en la solución

ANEXO E. Recta de calibración del HPLC y reporte de inulina para las mejores condiciones de extracción

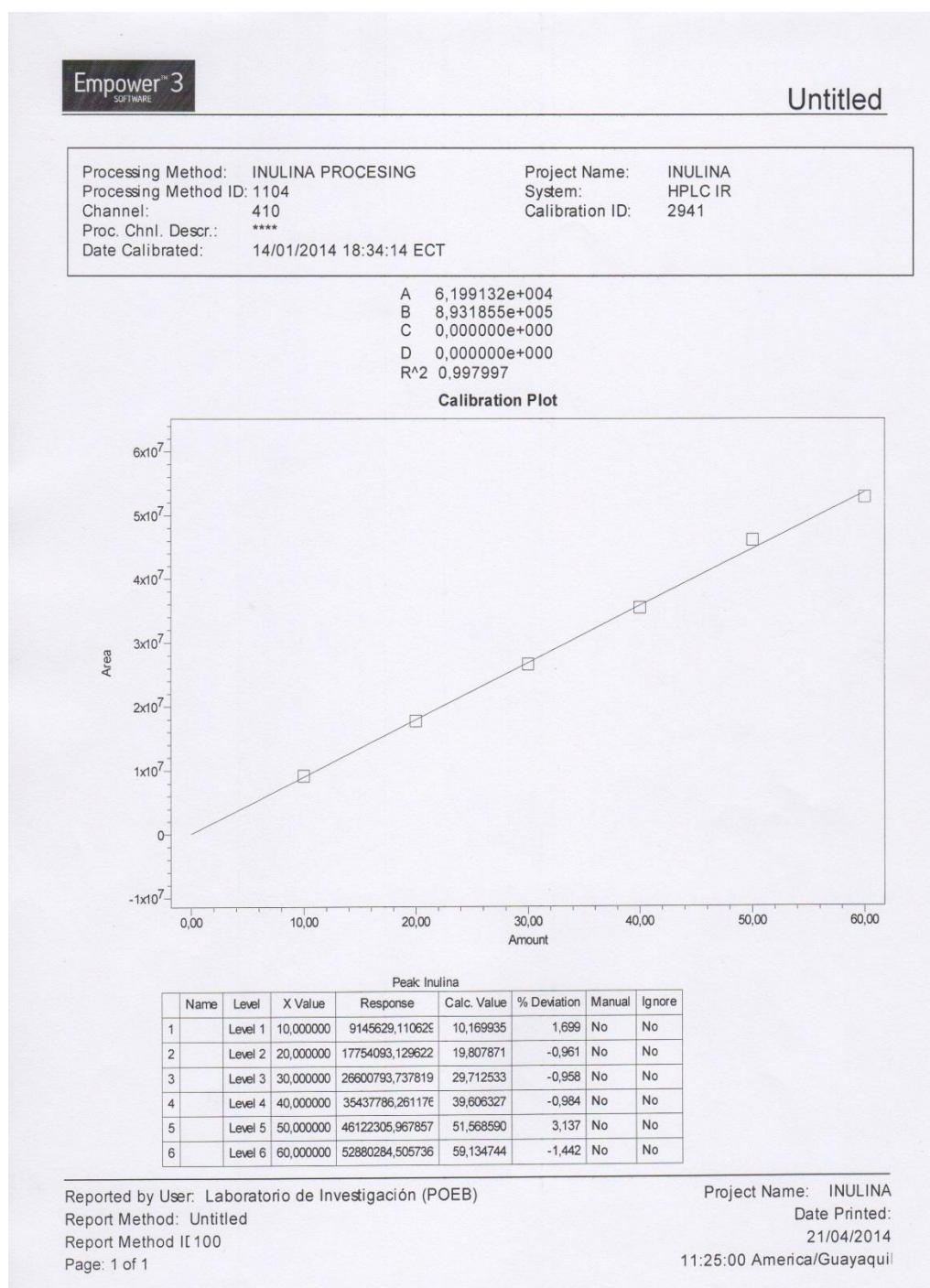


Figura E1. Curva de calibración

ANEXO E. (Continuación)

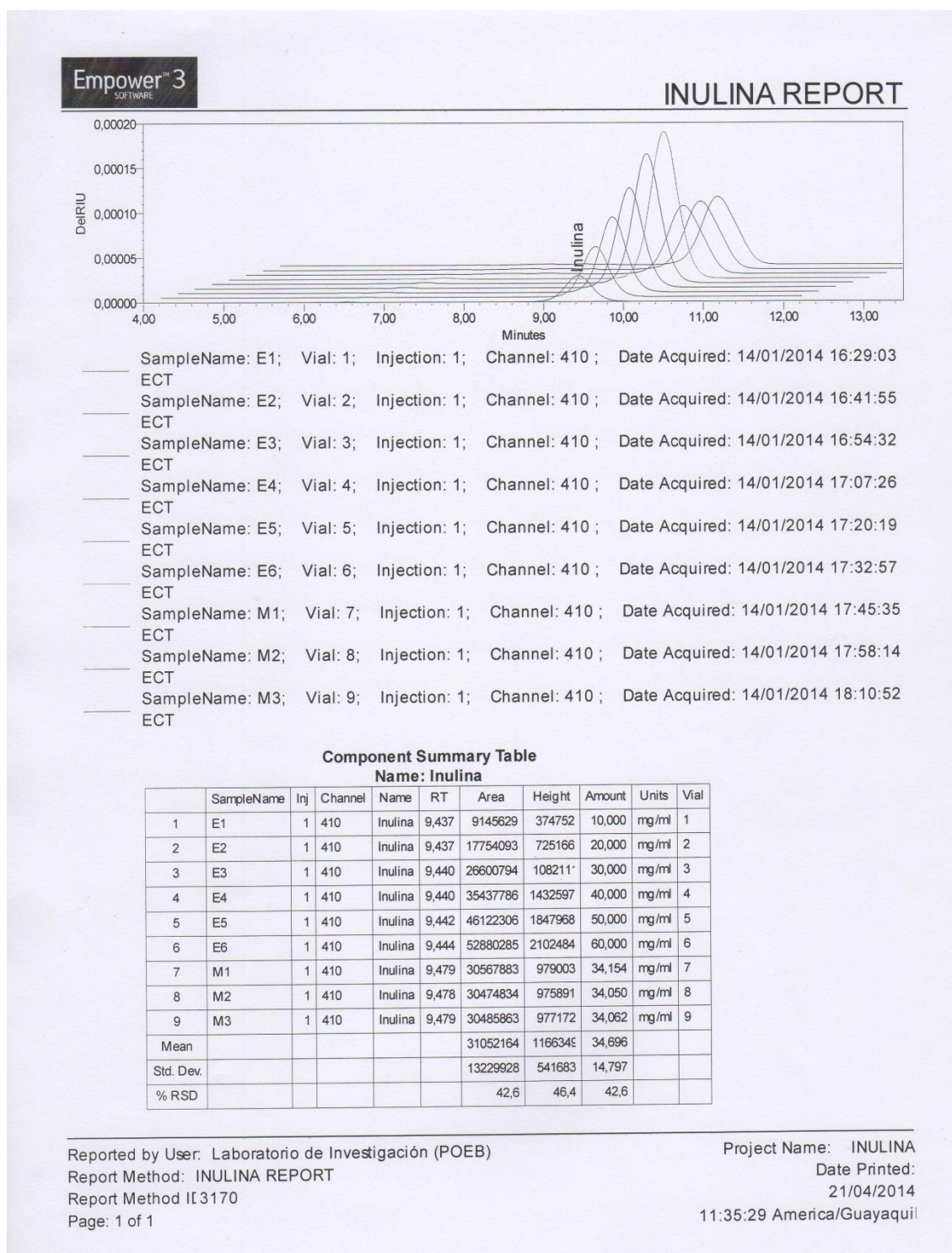


Figura E2. Reporte de resultados de inulina en la solución